

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON TRENIMON AUF
DIE CHROMOSOMEN UND DEN GENERATIONSZYKLUS
MENSCHLICHER LYMPHOZYTEN IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

cand. rer. nat. Karl Sperling
aus Kamenz/Sachsen

Berlin 1968

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON TRENIMON AUF
DIE CHROMOSOMEN UND DEN GENERATIONSZYKLUS
MENSCHLICHER LYMPHOZYTEN IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
cand. rer. nat. Karl Sperling
aus Kamenz/Sachsen

Berlin 1968



Erster Referent: Prof. Dr. H. Lüders
Zweiter Referent: Prof. Dr. G. Kümmel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.2.1969

Tag der Promotion:

23. JUNI 1969

Meinen Eltern gewidmet

Es ist eine alte Gewohnheit, einem geliebten Eltern-
paar, dem H. Eltern, die die Herausstellung und
die Herausstellung eines neuen Buches zu danken.

Es ist mir ein Bedürfnis, meinem verehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. H. Lüers, für die Themenstellung und
die Unterstützung dieser Arbeit sehr herzlich zu danken.

I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	7
III. Ergebnisse	
1. Morphologische Veränderungen der Chromosomen nach Trenimonbehandlung.....	16
2. Häufigkeiten der Translokationstypen.....	26
3. Versuchsserie A: Das Aberrationsmuster in Abhängigkeit von der Dosis.....	27
4. Versuchsserie B: Das Aberrationsmuster in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe.....	31
5. Versuchsserie C: Zur Frage der Einwirkungsdauer.....	35
6. Versuchsserie D: Autoradiographische Untersuchungen zur Veränderung des Markierungs- musters nach 8 stündiger Einwirkung.....	38
7. Interzelluläre Verteilung der Aberrationen.....	40
8. Interchromosomale Verteilung der Aberrationen.....	44
9. Intrachromosomale Verteilung der Brüche und Läsionen.....	48
10. Korrelationsanalyse zum Schädigungsmuster der Zellen.....	51
IV. Diskussion.....	54
V. Zusammenfassung.....	77
VI. Literatur.....	80
VII. Tabellen	

I. Einleitung

=====

Die Mutabilität ist eine der charakteristischen Eigenschaften des Lebendigen. Bei allen bisher daraufhin untersuchten Organismengruppen, angefangen bei den Viren und Bakterien bis hin zu den am höchsten entwickelten Vertretern des Tier- und Pflanzenreiches einschließlich des Menschen, konnten Mutationen, also bleibende Änderungen des Erbgutes, nachgewiesen werden. Ihre grundlegende Bedeutung liegt darin, daß sie neue, erbliche Varianten liefern und somit die Voraussetzung für die Evolution schaffen (LÜERS u. ULRICH 1959). Da die überwiegende Anzahl von ihnen jedoch das genphysiologische Gleichgewicht stört, können sie eine Belastung für das Individuum bedeuten und sogar den Bestand einer Population gefährden, wenn sie in zu großer Anzahl auftreten.

Die spontanen Gen-, Chromosomen- und Genommutationen sind jedoch so selten, daß systematische Untersuchungen an ihnen bei höheren Organismen wenig aussichtsreich erscheinen. Es lag daher nahe zu versuchen, die Mutationsrate durch Einwirkung physikalischer oder chemischer Agenzien zu steigern.

Bereits wenige Jahre nach Entdeckung der Mitose gelang es den Brüdern HERTWIG durch verschiedene Narkotika und Alkaloide aberrante Teilungsfiguren zu erzeugen, und schon 1904 beschrieb NEMEC ausführlich den Einfluß von Chloralhydrat auf die Chromosomen (zit.b.KOLLER 1954). Der erste Nachweis von chemisch induzierten Mutationen, die über mehrere Generationen verfolgt werden konnten, gelang F. WOLF 1909 an *Bacillus prodigiosus*, allerdings ohne daß die Natur der dabei auftretenden genetischen Varianten geklärt werden konnte (zit.b. STUBBE 1937).

Erst die Entdeckung MULLERS (1928), daß nach Behandlung mit Röntgenstrahlen die natürliche Mutationsrate bei *Drosophila* auf das rund 100fache gesteigert werden kann, gab den Anstoß zu der raschen Aufwärtsentwicklung der experimentellen Mutationsforschung der 30er Jahre. Die Suche nach wirkungsvollen chemischen Mutagenen wurde jedoch fortgesetzt, da man damit, im Gegensatz zu der relativ unspezifischen Wirkung der Strahlen, einen mehr gerichteten Eingriff am Erbgut erwartete.

Mitten im 2. Weltkrieg stellten sich hierbei die entscheidenden Erfolge ein, die, unabhängig voneinander, von OEHLKERS (1943) in Deutschland und von AUERBACH und ROBSON (1944) in England erzielt wurden.

Die Kenntnis über mutationsauslösende Faktoren hat seit dieser Zeit außerordentlich zugenommen. Es gehören dazu Strahlen sehr verschiedener Qualitäten, von schnellen Neutronen bis hin zum sichtbaren Licht (s. STUBBE 1961, EVANS 1962, WOLFF 1963), Chemikalien, die sich in ihrer Konstitution und Reaktionsweise z.T. erheblich unterscheiden (s. D'AMATO et al. 1956, RÖHRBORN 1960, SHARMA and SHARMA 1960, AITLMAN 1961 u. 1966, RIEGER u. MICHAELIS 1963 u. 1967), sowie lebende Organismen, insbesondere Viren (s. YERGANIAN et al. 1965, GRIPENBERG 1965, NICHOLS 1966), aber auch Protozoen (DIAZ u. PAVAN 1965) und möglicherweise Mycoplasmen (FOGH u. FOGH 1965).

Außer den bereits klassischen Untersuchungsobjekten wie z.B. der Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Maispflanze *Zea mays* wurden in jüngerer Zeit noch Mikroorganismen und Zellkulturen in die Mutationsforschung einbezogen. Im Verein mit dem raschen Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie, der 1953 zur Aufklärung der DNS-Struktur führte, erbrachte dies bereits recht genaue Vorstellungen über die biochemischen Vorgänge bei der Entstehung von Genmutationen (s. FREESE 1963). Bei der Deutung induzierter Chromosomenmutationen, mit denen sich die vorliegende Arbeit zu beschäftigen hat, ist man jedoch noch auf Hypothesen angewiesen. Dies beruht nicht zuletzt auf den unsicheren Vorstellungen über den submikroskopischen Bau der Chromosomen (s. SWIFT 1965, RIEGER u. MICHAELIS 1967).

In Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Behandlung lassen sich drei Arten von Chromosomenmutationen unterscheiden, die in der folgenden Mitose sichtbar werden. 1. Chromosomenaberrationen, sie werden insbesondere durch ionisierende Strahlen im präsynthetischen Abschnitt des Zellzyklus, der G_1 -Phase, induziert, wobei die Chromosomen funktionell einsträngig reagieren. Die später feststellbaren Schäden betreffen stets den gesamten Chromosomenquerschnitt. 2. Chromatidaberrationen, sie treten nach Behandlung während der DNS-Synthese (S-Phase) oder danach,

aber noch vor Mitosebeginn (G_2 -Phase) auf. Die Chromosomen bestehen zu dieser Zeit bereits aus zwei funktionellen Einheiten, die den beiden identischen Längshälften der Metaphasechromosomen entsprechen. In der Regel ist daher nur eine der beiden Schwesterchromatiden mutiert. 3. Aberrationen vom Subchromatid-Typ, sie werden induziert, wenn die Mutationsauslösung zu einem noch späteren Zeitpunkt als bei 2 erfolgt, nämlich an Prophasechromosomen. In der Folge hiervon ergeben sich Veränderungen an den strukturellen Untereinheiten der Chromatiden, den Subchromatiden.

Der weitaus größte Teil der bisher getesteten Chemikalien setzt nur Schäden auf chromatidaler Basis. Im wesentlichen rechnen dazu die achromatischen Läsionen, das sind mit Kernfarbstoffen nicht anfärbbare Lücken und die Brüche, also echte Diskontinuitäten in der Chromosomenstruktur. Hinzu kommen die Isochromatidbrüche, bei denen die beiden Schwesterchromatiden an offensichtlich homologen Stellen gebrochen sind, was vom morphologischen Bild her den Eindruck einer Chromosomenaberration erweckt. Kommt es nach Eintritt von je einem Bruch in den Chromatiden zweier verschiedener Chromosomen zu einem wechselseitigen Stückaustausch, so führt dies zu reziproken Translokationen (engl.: Interchanges).

Die quantitative Ausbeute an diesen Schädigungen wird mit bestimmt von der Reaktion der lebenden Zelle, die einmal zu Reparaturprozessen imstande ist, aber zum anderen so stark betroffen sein kann, daß sie noch in der Interphase abstirbt. Dieser letztere Effekt gehört zum Wirkungsmechanismus derjenigen pharmazeutischen Präparate, die sich durch ihre tumorhemmenden Eigenschaften auszeichnen, d.h., cytostatisch bzw. cytotoxisch wirken. Daher ist es nicht verwunderlich, daß ein großer Teil von ihnen auch mutagen ist und damit eine Gefährdung in sich birgt, auf die schon verschiedentlich hingewiesen wurde (LÜERS 1955, LÜERS u. RÖHRBORN 1961, RÖHRBORN 1965). Hierzu gehören zahlreiche Verbindungen aus der großen Klasse der alkylierenden Substanzen (s. ROSS 1962, LOVELESS 1966), von denen auf die Äthylenimine etwas näher eingegangen werden soll.

Bereits 1898 berichtete PAUL EHRLICH, der Begründer der modernen Chemotherapie, über die hohe nephrotoxische Wirkung

des Äthylenimins und führte dies auf einen direkten Angriff auf das Protoplasma zurück (zit.b.FEINE 1959). In den letzten Jahren wurden zahlreiche, unterschiedlich substituierte Äthylenimino-Verbindungen hergestellt (GAUSS u. PETERSEN 1957) und auf ihre klinische Verwendbarkeit hin untersucht. Dabei zeigte nach LINKE (1960) das Trenimon, eine Substanz, welche drei Äthylenimino-Gruppen an einem Benzochinongrundkörper aufweist, die stärksten cytostatischen und günstigsten pharmakodynamischen Eigenschaften.

Der entscheidende Schritt bei der Alkylierung durch diese Verbindungen ist die Bildung einer positiv geladenen Gruppe, die mit jedem nucleophilen Zentrum reagieren kann. Aus dem stark gespannten Dreiering entsteht zunächst eine reaktionsfreudige Zwischenstufe mit einem Carbeniumion (ROSS 1958),



welches sich dann mit organischen und anorganischen Anionen, primären bis tertiären N-Atomen, aber auch SH- und Sulfidgruppen verbinden kann.¹ Da diese Reaktionen relativ unspezifisch sind, können die alkylierenden Agenzien auf zahlreiche Stoffwechselvorgänge einwirken (S.WHEELER 1962, WARWICK 1963). Ein Vergleich der wirksamen Konzentrationen in vivo und in vitro - u.a. auch des Trenimon - zeigte jedoch, daß der primäre Angriffspunkt im Nukleinsäurestoffwechsel liegt (LISS u. PALME 1964, OBRECHT et al. 1968).

¹ Die hydrolytische Aufspaltung dieses Äthylenimino-Ringes steigt mit sinkendem pH-Wert an, wobei der Vorgang bei pH 6,5 (Krebszelle) viermal so schnell verläuft wie bei pH 7,2 (Normalzelle), was u.a. auch für das Trenimon bestätigt werden konnte (BERG u. HORN 1963).

Daneben können im speziellen Fall derartiger Chinonderivate, diese in vivo und in vitro in die dazugehörigen Hydrochinone überführt werden (FRIMMER 1960, zit.b.BERG u. HORN 1963). Durch Luftsauerstoff bereits werden diese reoxidiert, wobei neben dem ursprünglichen Chinon über Radikal-Zwischenprodukte H₂O₂ entsteht (BERG u. JAKOB 1962). Von diesem ist bekannt, daß es an Mäusetumoren Chromosomenmutationen zu induzieren vermag (SCHÖNEICH 1967). Indirekt - über die Bildung organischer Peroxyde - scheint es auch in biologischem Material für einen Teil der Strahlenwirkungen verantwortlich zu sein (SOBELS 1963, WALLING 1963).

Die Arbeitsgruppe um ALEXANDER nimmt an, daß die entscheidende Reaktion hierbei die Veresterung von Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ist, während SKIPPER und Mitarbeiter vermuten, daß insbesondere das N₇-Atom des Guanins der DNS-Helix leicht alkyliert werden könne (zit.b. JOHNSON u. BERGEL 1963).

In der Regel sind Verbindungen mit mehreren funktionellen Gruppen stärkere Cytostatika als monofunktionelle und auch wirkungsvollere Mutagene (BACQ u. ALEXANDER 1961, LÜERS u. RÖHRBORN 1965). Dies veranlaßte bereits 1949 GOLDACRE, LOVELESS und ROSS (zit.b. RIEGER u. MICHAELIS 1963) zur Annahme, daß polyfunktionelle Agenzien die Vernetzung zweier Moleküle bewirken ("cross-linking - hypothesis"), also z.B. zwei Guaninmoleküle miteinander verbinden können, was sich auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten DNS-Strängen nachweisen läßt (ALEXANDER et al. 1958, LAWLEY 1961).

Bei der Frage, wie es in der Folge zur Entstehung von lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomenmutationen kommt, ist man jedoch nur auf indirekte Vermutungen angewiesen. Erschwert werden zudem die Aussagen, da Untersuchungen mit verschiedenen Objekten und unterschiedlichen Methoden zum Teil abweichende Ergebnisse lieferten.

LÜERS u. RÖHRBORN (1965) haben daher an einem Objekt, der Taufolie Drosophila melanogaster, zahlreiche Substanzen getestet, die sich entweder im Grundkörper oder in der Zahl der funktionellen Gruppen unterschieden. Hierbei erwies sich, daß das Tenimon mit drei Äthylenimino-Gruppen eine wesentlich höhere Anzahl von rezessiv-geschlechtsgebundenen Lethalmutationen auszulösen vermag als das bifunktionelle Chinon I, welches noch deutlich über dem A 137, einem Mono-Äthylenimino-Naphtochinon, liegt.

Da die Kenntnisse über die Wirkung der gleichen Stoffe an verschiedenen Mutationssystemen heute noch mangelhaft sind, lag es nahe, diese Substanzen auch an einem anderen Objekt zu prüfen. Hierzu boten sich menschliche Blutzellen an, einmal im Hinblick auf die Beurteilung des oben erwähnten Testverfahrens für die Praxis und zum anderen aus medizinischem Interesse, da beide polyfunktionellen Benzochinonderivate als Cytostatika auch klinische Verwendung gefunden haben.

Mit Chinon I hat OBE (1967) dies in einer sehr gründlichen Arbeit unter Anwendung der sog. Mikromethode (ARAKAKI u. SPARKES 1963) bereits getan, wobei er die verschiedenen Chromatidaberrationen in Abhängigkeit von der Konzentration und dem Zeitpunkt der Substanzzugabe untersuchte, sowie deren inter- und intrazelluläre, aber auch intrachromosomale Verteilung. Über das Trenimon liegt bisher bei Blutzellen nur eine kurze Mitteilung von HAMPEL et al. (1966) mit der Makromethode vor (MOORHEAD et al. 1960). Dagegen wurde diese Substanz von einer Heidelberger Arbeitsgruppe ausführlich an Mäusen getestet (RÖHRBORN 1965, 1966 u. 1967, SCHLEIERMACHER 1966). Zudem wurden die cytostatischen Eigenschaften an verschiedenen Tumorgeweben in vivo und in vitro untersucht (DOMAGK et al. 1959, LINKE 1960, LISS u. PALME 1964, WEGEHAUPT u. SEHRBUNDT 1967).

Als sinnvolle Ergänzung und Erweiterung der Arbeiten von LÜERS u. RÖHRBORN (1965) einerseits, sowie OBE (1967) andererseits, schien es daher angebracht, das Trenimon auf menschliche Blutzellkulturen einwirken zu lassen.

Hierbei wurde zur Beurteilung des durch diese Substanz verursachten cytostatischen Effektes der Mitoseindex herangezogen. Als Maß für die mutagene Wirkung dienten die Veränderungen an den Chromosomen in Abhängigkeit von der Konzentration des Agens. Weiterhin wurde versucht, die Aberrationsausbeute sowie das Schädigungsmuster in Beziehung zu dem Zellzyklus zu setzen. Dafür wurde der Zeitpunkt der Substanzzugabe variiert. Das Mutagen blieb jedoch wie bei den oben zitierten Versuchen bis zur Aufarbeitung in den Kulturen. Zur Interpretation der Ergebnisse war es daher zusätzlich erforderlich, die tatsächliche Einwirkungszeit des Trenimon, die Einwirkungsdauer, zu bestimmen. Auch dann kann jedoch noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, in welchem Abschnitt des Zellzyklus die beobachteten Schäden induziert wurden, da die normale, aus der Literatur bekannte, Generationsdauer der Blutzellen nach Behandlung mit einem Cytostatikum verändert wird. Es ergab sich insbesondere die Frage, welche der analysierten Zellen in der G_2 -, welche noch in der S-Phase dem Mutagen ausgesetzt waren. Hierzu wurden autoradiographische Experimente durchgeführt, die so angelegt waren, daß das zugesetzte 3H -Thymidin bis zur Aufarbeitung in den Kulturen bleiben konnte. Danach war es dann möglich, auch die inter- und

intrazelluläre Verteilung der Aberrationen in Abhängigkeit von dem Zellzyklus zu untersuchen, sowie die Lage der Schäden auf den Chromosomen unter diesem Gesichtspunkt zu betrachten.

II. Material und Methodik

=====

Sämtliche Experimente wurden mit der leicht abgewandelten Mikromethode von ARAKAKI und SPARKES (1963) durchgeführt.

In 30 ml fassende Kulturfläschchen wurden nacheinander hinzugegeben:

- a) 4,28 ml Medium 199 (Difco),
- b) 0,8 ml Serum (für die Versuchsserien A und B fötales Kälberserum, für C und D Humanserum AB, Rh⁺),
- c) 0,1 ml Phytohämagglutinin M (Difco),
- d) 0,02 ml eines Streptomycin - Penicillin-Gemisches (enthält 1 mg Streptomycin und 100 i.E. Penicillin),
- e) 0,2 ml Kapillarblut (der Fingerbeere mit einer heparinisierten Spritze - Heparin Vitrium - entnommen).

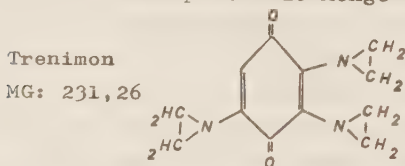
Alle Kulturen wurden einheitlich mit dem Blut einer gesunden, 25jährigen männlichen Person (Blutgruppe O, Rh⁺) angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei $37 \pm 0,3^{\circ}$ C. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß der Mitoseindex (MI) nach 96stündiger Kulturdauer besonders hoch war, worauf auch schon CARSTAIRS (1961), SCHMID (1963) und CARON (1965) hingewiesen hatten. Daher erfolgte der Abbruch der Kulturen stets nach vier Tagen, nachdem zuvor jedem Fläschchen 0,1 mg Colcemid hinzugefügt worden waren.

Die Aufarbeitung geschah nach der etwas modifizierten Lufttrockentechnik von ROTHFELS und SIMONOVITCH (1958), wobei folgenden Schritte von Bedeutung sind:

- a) das abzentrifugierte Zellsediment wird 20 Minuten lang einem hypotonen Schock im Wasserbad bei 37° C ausgesetzt durch Zugabe von 1,5 - 2 ml eines Gemisches aus Hank's Lösung und aqua dest. (1 : 5),
- b) die Fixierung erfolgt mit Methanol/Eisessig (3 : 1),
- c) jeweils ein Tropfen der zum Schluß auf etwa 0,5 - 1 ml verdünnten Zellsuspension wird entweder auf einen fett- und staubfreien, trockenen Objektträger gegeben oder auf einen feuchten, eisgekühlten und dann abgetrocknet,

- d) nach dem Anfärben mit Orcein (2%) und Entwässern in 96%igem und absolutem Alkohol wird in Euparal eingebettet.

Von der zu testenden Substanz (Trenimon) wurden mindestens 5 mg abgewogen. Der Wägefehler ist unerheblich, da die benutzte Waage auf $\pm 0,005$ mg genau anzeigt. Diese Probe wurde in 1 Liter aqua bidest. aufgelöst, was ungefähr 15 Minuten dauerte. Sofort danach erfolgte die tropfenweise Zugabe in die Kulturen. Hierbei wurde stets die gleiche, geeichte Nadel verwandt (10 Tropfen $\hat{=}$ 0,1 ml), wobei nie mehr als 0,1 ml appliziert wurde. Durch vorsichtiges Umschütteln wurde die Substanz gleichmäßig in der Kulturflüssigkeit verteilt. Dieser Handgriff wurde nach einer halben Stunde und dann jeden Tag zweimal wiederholt. Die Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge aqua bidest.



Die Aufarbeitung der autoradiographischen Präparate erfolgte bis zum Anfärben - unter Einhaltung der vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen - genauso wie bei den vorherigen Versuchen. Die weiteren Arbeitsgänge wurden dann in Anlehnung an SCHMID (1965) wie folgt durchgeführt:

- a) die Rückseite der Objektträger und die zellfreie Vorderseite werden mit Chromalaungelatine bestrichen (Lösung von 0,5 % Gelatine und 0,05 % Kalium-Chromalaun in aqua dest.), wodurch ein Verschieben des Filmmaterials verhindert wird,
- b) die Präparate werden mit einem "Stripping-Film" (Kodak A.R. 10) bedeckt, der zuvor 2 - 3 Minuten quellen konnte,
- c) in einem lichtdichten Behälter werden die Präparate 4 Stunden im Luftstrom getrocknet,
- d) sie werden dann - vor jeglichem Lichtzutritt geschützt - bei $+ 4^{\circ}$ C 96 Stunden lang exponiert,
- e) entwickelt wird 4 Minuten lang (Kodak Entwickler D 19b), nach Abspülen im Wasserbad dauert das Fixieren 8 Minuten (Kodak Fixiersalz AL 4), und anschließend wird 2 1/2 Minuten gewässert,
- f) die luftgetrockneten Präparate werden schließlich durch absoluten Alkohol geführt und in Euparal eingebettet.

Versuchsserie A

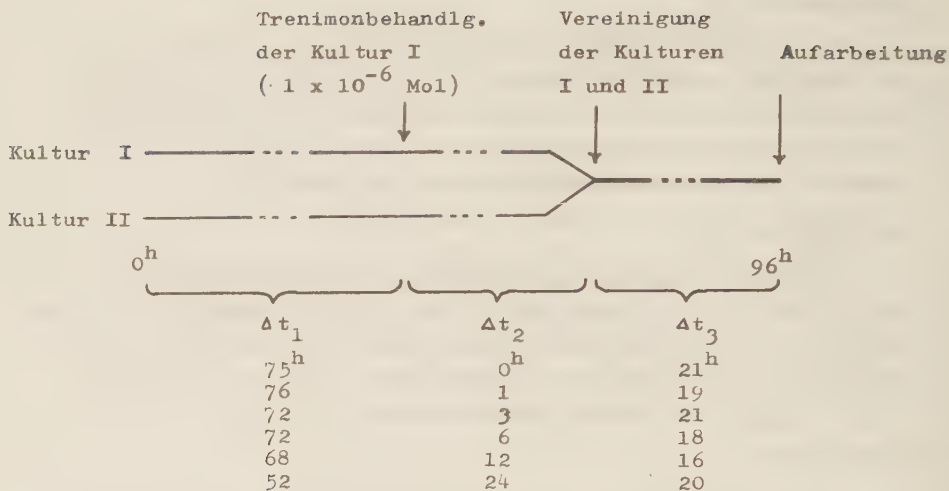
Um eine Dosis-Effekt-Beziehung aufstellen zu können, wurde das Trenimon jeweils 24 Stunden vor der Aufarbeitung in den verschiedenen Konzentrationen von 0,25, 0,75, 1,0, 2,5, 5,0 und $10,0 \times 10^{-7}$ Mol hinzugegeben und bis zum Schluß in den Kulturen belassen. Die Einwirkungszeit betrug also einen Tag.

Versuchsserie B

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der induzierten Aberrationen vom Generationszyklus der Zellen wurde die Menge der Substanz konstant gehalten ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol), jedoch der Zeitpunkt der Zugabe variiert. Die Applikation erfolgte: 2, 8, 12, 16, 20, 24 und 40 Stunden vor Abbruch der Kulturen.

Versuchsserie C

Diese Experimentenreihe diente zur Feststellung der Einwirkungsdauer des Trenimon, d.h. der tatsächlichen Einwirkungszeit. Die technische Durchführung soll zunächst etwas vereinfacht dargestellt werden. Kulturen von transformierten Lymphocyten wurden mit einer so hohen Trenimon-dosis versetzt, daß keine der Zellen mehr in die Mitose eintreten konnte. In bestimmten Zeitabständen wurden diesen eine gleiche Menge an Lymphocyten aus unbehandelten Kulturen hinzugefügt. Falls noch etwas von dem Mutagen vorhanden ist, müßten diese Zellen jetzt geschädigt werden. Sie dürfen aber nicht so stark betroffen sein, daß sie nicht mehr teilungsfähig sind, da ja die Veränderungen an den Chromosomen festgestellt werden sollen. Aus diesem Grunde wurde eine anfängliche Trenimon-dosis von 1×10^{-6} Mol gewählt (Mitoseindex 0), bei der nach Verdünnung auf die Hälfte (5×10^{-7} Mol), das entspricht also dem Zusatz der zweiten Kultur, der Mitoseindex deutlich über 0, bei etwa 0,8 lag. Auch wenn die Wirksamkeit des Trenimon in der ersten Kultur in dem Zeitintervall zwischen der Substanzzugabe und der Vereinigung mit der zweiten Kultur nicht zurückgegangen war, sollten also dennoch Mitosen auftreten. Es ist daher zu erwarten, daß unter diesen Bedingungen das gewählte System ein Nachlassen der Mutagenität recht empfindlich anzeigt. Den genauen Versuchsplan gibt die folgende graphische Darstellung wieder:



Die Zellen der Kulturen I können hiernach zunächst eine Zeitlang (Δt_1) wachsen, bis ihnen eine Trenimondosis von 1×10^{-6} Mol zugegeben wird. In bestimmten Abständen (Δt_2) von 0, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden werden diese Kulturen dann mit den zweiten, noch unbehandelten, vereinigt. Die Aufarbeitung erfolgt nach mindestens 16stündiger gemeinsamer Inkubationszeit (Δt_3).

Versuchsserie D

Um festzustellen, wie viele der auf ihr Aberrationsmuster hin untersuchten Zellen nach 8stündiger Einwirkungszeit des Trenimon noch in der Synthesephase geschädigt werden konnten, wurde gleichzeitig mit dem Mutagen $1 \mu\text{C/ml}$ ^3H -Thymidin (^3H -TdR; spez. Aktivität: $5,0 \text{ C/Mol}$, Radiochemical Centre Amersham, England) appliziert. Die Colcemidzugabe erfolgte wie üblich 4 Stunden vor der Aufarbeitung, so daß also diejenigen Zellen auf ihr Markierungsmuster hin untersucht wurden, die zum Zeitpunkt der Substanzzugabe noch 4 - 8 Stunden bis zum Eintritt in die Mitose benötigten. Den unbehandelten Kulturen wurde ganz entsprechend 8 Stunden vor dem Ende der Inkubationszeit das ^3H -TdR verabreicht. Die Colcemidzugabe erfolgte dagegen nicht nur 4, sondern auch 5 und 6 Stunden vor der Aufarbeitung. Es wurden also diejenigen Lymphocyten erfaßt, die 4-8, 3-8 und 2-8 Stunden bevor sie in der Mitose arretiert wurden, die Möglichkeit besaßen, das Isotop in die DNS einzubauen.

Der Mitoseindex wurde bestimmt, um einen Grundparameter der cytostatischen Wirkung nicht unbeachtet zu lassen. Hierzu wurden für jeden Kurvenpunkt der behandelten Kulturen mindestens 5000 Zellen gezählt, bei den Kontrollen jeweils 1000, die sich auf wenigstens 3 Präparate verteilten. Ausgewertet wurde innerhalb des mittleren Bereiches der Objektträger, wobei auch kleine Zellen miterfaßt wurden. Bei diesen kann es sich nämlich einmal um nicht-transformierte Lymphocyten, zum anderen aber auch um - infolge der Substanzeinwirkung - degenerierte, pyknotische Elemente handeln. Das Verhältnis von sich teilenden Zellen zur Gesamtzahl - ausgedrückt in Prozent - ist dann der Mitoseindex.

Für die quantitative Auswertung wurden die achromatischen Läsionen (AL) und die Brüche (B'), die Isochromatidbrüche (B'') und die Translokationen (RB') berücksichtigt. Sie wurden so protokolliert, daß sich für jede Zelle sofort das Aberrationsmuster feststellen läßt. Die 0 in dem hierzu angefertigten Schema würde bedeuten, daß eine Metaphaseplatte gefunden wurde, die 3 Brüche, 1 achromatische Läsion und zwei Isochromatidbrüche, jedoch keine Translokation aufwies.

AL pro Zelle	B'' pro Zelle	B' pro Zelle					
		0	1	2	3	...	>10
0	0						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	>5						
1	0						
	1						
	2				0		
	3						
	4						
	5						
	>5						
⋮							
> 6	0						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	>5						

Die Zahl der RB' pro Zelle wurde als Ziffer direkt eingetragen.

Zellen mit mehr als 10 Brüchen wurden in einer Rubrik zusammengefaßt. Das Gleiche galt, wenn mehr als 6 achromatische Läsionen, über 5 Isochromatidbrüche bzw. vier oder mehr Translokationen auftraten. Die Einteilung wurde so gewählt, daß diese Sammelklassen überhaupt nur besetzt werden, wenn hohe Trenimonkonzentrationen einwirken. Auch dann ist jedoch nur ein geringer Prozentsatz aller Zellen darin zusammengefaßt (vgl. Abb. 27-31). Für den 2- und 8-Stunden-Termin der Versuchsserie B mußten die Klassen der Läsionen erweitert werden.

Für jeden Kurvenpunkt der Versuchsserie A wurden 200 Metaphaseplatten erfaßt, für B und C jeweils 100. In der Versuchsserie D wurden aus den unbehandelten Kulturen jeweils ca. 300 Mitosen auf ihr Markierungsmuster hin untersucht; bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trenimon und ^3H -TdR waren es 92. Die Zellen stammten aus mindestens 2 Kulturen, deren Ergebnisse zuvor auf Homogenität geprüft wurden.

Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz-Mikroskop (Laborlux) mit Phasenkontrasteinrichtung. Ein Teil der Zellen wurde fotografiert (Leitz-Mikroansatz mit Leicagehäuse; Agepe-Film von Agfa). Alle Chromosomenmutationen, sofern sie noch speziell analysiert werden sollten, wurden von den Negativen mit Hilfe eines Filmlesegerätes (Phywe) abgezeichnet (Vergrößerung des Objektes 4500 x). Gleichzeitig wurden die geschädigten Chromosomen nach dem Denver Abkommen (1960) identifiziert. Da aber an Hand von morphologischen Kriterien eine sichere Zuordnung aller 23 Paare nicht möglich ist (PATAU 1960 u. 1965), wurden nur die Elemente 1, 2, 3 und 16 einzeln erfaßt, die anderen gruppenweise: 4-5; 6-12,X; 13-15; 17-18; 19-20 und 21-22,Y.

Um die Lage der Brüche und Läsionen auf den Chromatiden zu bestimmen, wurden Messungen an den Zeichnungen mit Hilfe eines Stechzirkels ausgeführt (GALPERIN u. ROSS 1966). Insgesamt wurden 800 Läsionen und 400 Brüche lokalisiert.

Weiterhin wurden 315 Translokationen zeichnerisch erfaßt, die jeweils nur 2 Centromere aufwiesen. Bei 221 von ihnen konnten die Chromosomen an Hand der im Mikroskop eingestellten Metaphaseplatten, entsprechend dem oben angegebenen Verfahren, identifiziert werden.

Vor der Darstellung der Ergebnisse erscheint es angebracht, noch auf die Stoffwechselphysiologie und insbesondere den Generationszyklus des verwendeten Zellsystems einzugehen.

Das heute gebräuchlichste Verfahren, um menschliche Chromosomen zu erhalten, stellt die Blutkulturmethode dar. Durch einen Zufall entdeckte NOWELL (1960), daß sich unter dem Einfluß von Phytohämagglutinin, einem Extrakt aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, kernhaltige Zellen des peripheren Blutes in unreif erscheinende, blastoide Zellen umwandeln, die sich teilen können. Es wird allgemein angenommen, daß die kleinen Lymphocyten diese Transformation als Folge einer Antigen (= PHA) - Antikörper (= γ -Globuline)-Reaktion vollziehen (ROBBINS 1964, MELLMAN 1965).

Damit verbunden ist eine starke Steigerung des Zellmetabolismus, die eingeleitet wird durch eine bemerkenswerte Gen-Aktivierung. Sofort nach Zugabe des PHA kommt es offensichtlich zu einer Acetylierung (POGO et al. 1966) und Phosphorylierung (KLEINSMITH et al. 1966) der Kernproteine, zwei Vorgängen, durch die die "Inhibitory-Histone" von der DNS entfernt werden sollen. Diese wird damit als Matritze für die RNS-Synthese freigegeben, welche bereits wenige Minuten nach der PHA-Stimulierung exponentiell anzusteigen scheint (POGO et al. 1966).

Es setzt nun eine Produktion zahlreicher Enzyme ein, die an der oxydativen Phosphorylierung und an der Glycolyse beteiligt sind (LUCAS 1967). Letztere stellt offensichtlich die Hauptenergiequelle für die erhöhte Stoffwechselaktivität dar (POLGAR et al. 1968). Zudem wird die Synthese von γ -Globulinen eingeleitet, welche im Medium mit Hilfe der Papierelektrophorese nachgewiesen werden konnten (HIRSCHHORN et al. 1963).

In den Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der RNS-Synthese bei den mit PHA versetzten Blutkulturen gehen die absoluten Angaben z.T. weit auseinander (vgl. FLIEDNER et al. 1965, HAYHOE u. QUAGLINO 1965, NEWSOME 1966, WINTER u. YOFFEY 1966). Es scheint jedoch, daß bis zu 24 Stunden ein recht steiler Anstieg erfolgt, was auch morphologisch durch die Entwicklung der Nucleoli angezeigt wird (MAC KINNEY et al. 1961). Später nimmt die Syntheserate noch zu. Sie dürfte ein Maximum nach etwa 50 Stunden erreichen (SALZMAN et al. 1966, TORELLI et al. 1966). Wie nach Zugabe von ^3H -Uridin ermittelt wurde, ist dann jedoch die Markierung hauptsächlich im Cytoplasma zu finden (NEWSOME 1965, WINTER u. YOFFEY 1966). Über die Natur der RNS-Fractionen liegen Untersuchungen von RUBIN und COOPER (1965), COOPER und RUBIN (1966) und SALZMAN et al. (1966) vor.

Einen ähnlichen Verlauf wie die RNS-Synthese nimmt auch die Bildung neuer Proteine (TORELLI 1966), die nach SHAPIRO und LEVINA (1967) in der S- und G_2 -Phase rund 2-3mal höher ist als in der G_1 . Auch in Pro- und Metaphasechromosomen konnte der Einbau von markierten Aminosäuren festgestellt werden. Die Untersuchung der chromosomalen Proteinsynthese mittels ^3H -Leucin ergab jedoch nicht das für die späte DNS-Syntheseperiode charakteristische Replikationsmuster der Chromosomen. Nach CAVE (1967) spricht dies dafür, daß die Synthese der chromosomalen Proteine nicht besonders eng mit der des genetischen Materials verknüpft ist.

Die meisten dieser stoffwechselphysiologischen Ergebnisse sind bisher von anderen Autoren noch nicht bestätigt worden. Sehr viel mehr Untersuchungen liegen dagegen zur Verdopplung des DNS-Bestandes während der Interphase und allgemein zum Generationszyklus dieser Zellen vor.

Die kleinen Lymphocyten befinden sich beim Ansetzen der Kultur in der G_0 -Phase, einem sog. Ruhestadium, das noch nicht zu dem Mitosezyklus gerechnet wird (LATHJA 1963). Nach Zugabe des PHA treten sie in die präsynthetische- oder G_1 -Periode ein, denn sie haben ihren DNS-Gehalt noch nicht verdoppelt. Nur rund 0,5% der Zellen sind in der Lage, bereits jetzt ^3H -Thymidin, eine spezifische Vorstufe der DNS, einzubauen. Die Zellen befinden sich fast sämtlich im gleichen Stadium, d.h. ihr Synchronisationsgrad ist zu diesem Zeitpunkt besonders hoch. Der eigentliche Beginn der DNS-Synthese setzt nach 24-30 Stunden ein (MICHALOWSKI 1963, CARON 1965, MUKHERJEE u. SINHA 1965).

Nach früheren Ergebnissen von MAC KINNEY (1961), BENDER und PRESCOTT (1962), sowie MICHALOWSKI (1963) nimmt die Syntheserate annähernd gleichmäßig zu, bis nach 72 Stunden ein Maximum an Zellen vorliegt, die sich in der ersten Teilung befinden. Nachuntersuchungen von CARE (1966), SASAKI und NORMAN (1966) und HEDDLE et al. (1967) führten jedoch zu dem Schluß, daß ein Drittel oder sogar mehr als 70% der Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits die zweite Mitose durchmachen.

Damit hängt zusammen, daß die Angaben zur durchschnittlichen Dauer der G_1 -Phase z.T. weit auseinandergehen. Die neueren Ergebnisse machen es aber wahrscheinlich, daß die der PHA-Stimulierung folgende erste G_1 -Periode rund 24-30 Stunden anhält (s.o.), die nächste nur noch 5-6 Stunden (CARE 1966, SASAKI and NORMAN 1966).

Entsprechendes scheint auch für die Syntheseperiode zu gelten. Die Zeitangaben hierzu zeigen eine erhebliche Streuung, während sonst für viele Säugerzellen dieser Abschnitt einheitlich rund 7-8 Stunden dauert (MOORHEAD u. DEFENDI 1963, DEFENDI u. MANSON 1963, PILGRIM u. MAURER 1965). Vermutlich ist bei der künstlichen Induktion der Lymphocyten durch das PHA für die erste DNS-Replikation mehr Zeit erforderlich - mindestens 12 Stunden, wobei einzelne Zellen z.T. sehr viel länger benötigen (BENDER u. PRESCOTT 1962, SANDBERG 1964, BIANCHI u. DE BIANCHI 1965) - als für die zweite, die mit etwa 9 Stunden (CARE u. LEVITZKY 1966, CARE 1966) nicht wesentlich von den Verhältnissen bei menschlichen Fibroblastenkulturen (MOORHEAD u. DEFENDI 1963, MACIEIRA-COELHO u. PONTEN 1966, COMINGS 1967) bzw. Dauerstämmen gleicher Herkunft (TROWELL 1966, TOLIVIERI u. SIMON 1967) abweicht.

Experimentell am einfachsten läßt sich die postsynthetische oder G_2 -Phase bestimmen, so daß hierzu besonders viele Untersuchungen vorliegen, die relativ übereinstimmend etwa 4 Stunden als durchschnittliche Dauer ergeben haben. Dies steht im Einklang mit den Angaben für andere menschliche Zellkulturen. (Literatur s. GERMAN 1966).

Für die Dauer des Mitoseablaufes ergaben sich für transformierte Lymphocyten bei der Anwendung indirekter Methoden 2 Stunden (SASAKI u. NORMAN 1966, HEDDLE et al. 1967), bei direkter kinematographischer Untersuchung 30 Minuten (MARSHALL et al. 1965). HeLa-Zellen teilten sich in ungefähr einer dreiviertel Stunde (KOZUKA u. MOORE 1966).

Bei einem Vergleich der bisherigen Ergebnisse muß man noch berücksichtigen, daß die Dauer des Generationszyklus individuell verschieden sein kann (GERMAN 1964, HEDDLE et al. 1967). Außerdem treten z.T. erhebliche Variationen von Zelle zu Zelle auf (BENDER u. PRESCOTT 1962, ATKINS et al. 1966), was u.a. darauf zurückzuführen sein könnte, daß die Lymphocyten möglicherweise keine einheitliche Fraktion darstellen (MICHALOWSKI 1963). Alles in allem ist es dann am wahrscheinlichsten, daß der erste Zellzyklus, der nach der PHA-Zugabe abläuft, länger dauert als die folgenden. Diese haben eine Generationsdauer von 20-22 Stunden, welche auch für andere menschliche Zellstämme und viele Säugerewebe charakteristisch ist. Nach 72stündiger Inkubationszeit

haben sich viele Zellen dann bereits ein zweites Mal, nach 96 Stunden ein Teil sogar ein drittes Mal geteilt. Der anfänglich hohe Synchronisationsgrad nimmt mit zunehmender Kulturdauer ab.

III. Ergebnisse

=====

1. Morphologische Veränderungen der Chromosomen nach Trenimon- behandlung

Der quantitativen Darstellung der Versuchsergebnisse soll eine Beschreibung der am Chromosomenapparat induzierten qualitativen Veränderungen vorausgeschickt werden. Die Verlässlichkeit ihrer Beurteilung ist auch für die Entwicklung von Vorstellungen zur Kinetik der Aberrationsentstehung von Bedeutung. Unterschiedliche Vorstellungen auf der einen Seite können zu gegensätzlichen Auffassungen auf der anderen Seite führen (vgl. RIEGER 1966 S. 42). Gleichzeitig soll auf die relative Häufigkeit der verschiedenen Schädigungen hingewiesen werden, da hieraus hervorgeht, welche von ihnen in die quantitative Auswertung einzubeziehen sind.

Trenimon erzeugt nahezu ausschließlich Mutationen auf chromatischer Basis. Die Zuordnung zu den verschiedenen Strukturtypen ist nicht immer leicht, da die menschlichen Chromosomen verhältnismäßig klein sind. Prinzipiell lassen sich jedoch die gleichen Veränderungen nachweisen, die an den wesentlich längeren Elementen von *Vicia faba* z.B. nach Behandlung mit alkylierenden Verbindungen auftreten (MICHAELIS, RIEGER u. SIEDER 1964).

Achromatische Läsionen (AL)

Für diesen Aberrationstyp wurden in der anglo-amerikanischen Literatur eine Reihe synonyme Ausdrücke geprägt, die sinngemäß ins deutsche Schrifttum übernommen wurden. "Achromatic lesion" wurde mit achromatischer Läsion, Lücke oder Region übersetzt; aus "non-staining gaps" wurden Färbelücken, und die Kurzbezeichnungen "gap" bzw. "lesion" behielt man nahezu unverändert als "Gap" und "Läsion" bei.

Abb. 3 vermittelt einen Eindruck von dem morphologischen Bild dieser Schädigung, wobei am häufigsten die Fälle Abb. 3a und 3b gefunden werden, bei denen auf der in Lage und Länge unveränderten Chromatide eine mit Orcein kaum oder gar nicht anfärbbare Zone auftritt, deren Größe recht unterschiedlich sein kann. Hierbei handelt es sich aber um keine echte Unterbrechung der Chromosomen-



Abb. 1

Übersichtsbild aus einem Kontrollpräparat, das 6 Mitosen
und die gleiche Anzahl von Interphasekernen zeigt.
(Vergrößerung rd. 300 x)



Abb. 2

Ungeschädigte Meta-
phaseplatte einer
Kontrolle.
(Vergrößerung rd. 1500x)

struktur, was schon aus der Abb. 3c hervorgeht. Obwohl die Paarung der Schwesterchromatiden nicht mehr gegeben ist, hat dennoch der Schenkel, der die Läsion aufweist, seine Gestalt unverändert beibehalten. Es kommt allerdings vor, daß er an dieser Stelle etwas abgelenkt ist (Abb. 3e). Nur selten ist das Stück distal der Läsion verlagert (Abb. 3g). Dann zeigt nur eine dünne Chromatinverbindung an (vgl. auch Abb. 3e und 3f), daß kein echter Bruch vorliegt. Daraus geht schon hervor, daß die Abgrenzung zu diesem Aberrationstyp nicht immer eindeutig ist.

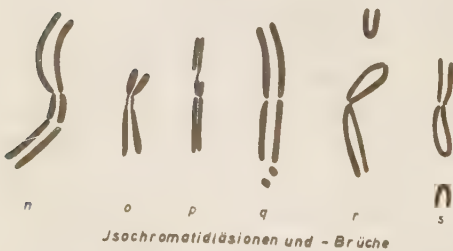
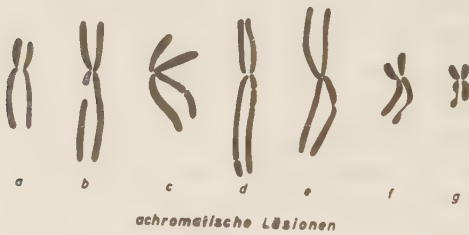


Abb. 3

Verschiedene Aberrationstypen, die nach Einwirkung von Trenimon an menschlichen Chromosomen auftreten.

Brüche (B')

Hierbei handelt es sich um echte Diskontinuitäten der Chromosomenstruktur. Das abgebrochene Stück kann - in seltenen Fällen - verlorengehen (Abb. 3m). Meistens bleibt es aber an homologer Stelle mit der Schwesterchromatide gepaart (Abb. 3i, 3k, 3l), nicht selten an der gegenüberliegenden Seite (Abb. 3h).

Dies dürfte eine Folge der Abwicklung der in der Prophase noch umeinander gewundenen Chromosomenschenkel sein, wobei sich das distale Bruchstück als selbständige Einheit verhält. Die intakte Chromatide ist sehr oft in charakteristischer Weise abgeknickt (Abb. 3i, 3k, 3l) und kann an der dem Bruch gegenüberliegenden Stelle eine Läsion zeigen (Abb. 3p). Die Bruchflächen sind abgerundet, das Fragment manchmal kugelig (Abb. 3l), anscheinend heterochromatisiert (OBE 1967).

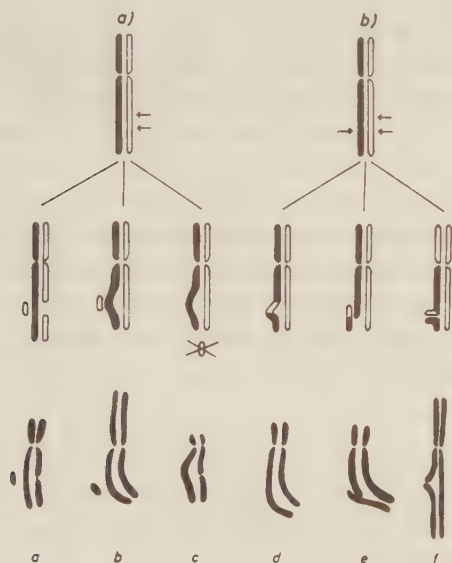


Abb. 4

Interstitielle Deletionen (a) und Duplikations-Deletionen (b), die nach Einwirkung von Trenimon an menschlichen Chromosomen auftreten und deren hypothetische Entstehungsweise. Die Pfeile weisen auf die Bruchstellen hin.

Intrachromosomale Umbauten

Interstitialle Deletionen und Duplikations-Deletionen sind bei Vicia sicher festzustellen. Es gibt auch an menschlichen Chromosomen eine Anzahl verschiedener struktureller Veränderungen, die dazu gerechnet werden können. In Abb. 4 ist der Versuch unternommen worden, deren Entstehungsweise schematisch abzuleiten. Zahlenmäßig spielen sie und andere Intrachange jedoch keine Rolle.

Isochromatidaberrationen

Sind die Chromatiden an offensichtlich homologen Stellen nicht anfärbbar oder gebrochen, spricht man von Isochromatid-Läsionen (AL") (Abb. 3n) bzw. Isochromatid-Brüchen (B") (Abb. 3q, 3r, 3s). Die AL" treten in den Versuchen nur dann in nennenswerter Häufigkeit auf, wenn das Trenimon den Kulturen kurz vor der Aufarbeitung zugegeben wurde. Sie wurden deshalb im Gegensatz zu den B" in die quantitative Auswertung nicht mit einbezogen. Die Bruchstücke zeigen teilweise noch eine Lagebeziehung zu dem Restchromosom (Abb. 3q). Schwesterstrangreunionen wurden ebenfalls - wenn auch nur vereinzelt - gefunden (Abb. 3r u. 3s), wobei in den meisten Fällen alle vier Bruchenden verheilt waren.

Interchromosomale Umbauten

Dazu zählen in erster Linie Strukturveränderungen, bei denen zwei Segmente zwischen verschiedenen Chromosomen wechselseitig ausgetauscht wurden. Dieses kann zu einem dizentrischen Chromosom und einem centromerlosen Reunionsprodukt führen, man spricht dann von einem asymmetrischen Interchange (A). Im Falle einer symmetrischen Translocation (S) ist der monokinetische Zustand erhalten geblieben. Da die Schwesterchromatiden in der Metaphase weitgehend gepaart bleiben, führen diese Umbauten in der darauffolgenden Teilung zu charakteristischen Kreuzfiguren (Abb. 5), die eine sichere Unterscheidung zwischen asymmetrischen und symmetrischen Formen gestatten.

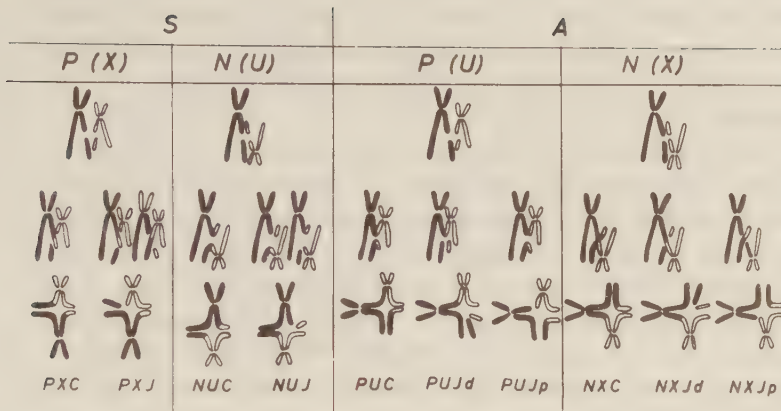


Abb. 5

Schematische Darstellung der Entstehungsweise verschiedener Translokationstypen, die sich aus je zwei Chromosomen zusammensetzen (nach OBE 1967)
Erklärung der Abkürzungen s. S. 94

Je nachdem, ob die Centromere der beteiligten Chromosomen auf denselben Pol oder verschiedene Pole ausgerichtet waren, als es zur Reunion kam, kann man zusätzlich noch eine Unterteilung in polarisierte (P) und nicht-polarisierte (N) Interchange vornehmen. Diese Typen lassen sich jedoch nicht direkt feststellen. Nach OBE (1967) kann man aber erkennen, ob die Verheilung der Bruchenden überkreuz (X) oder U-förmig (U) erfolgte. Da diese Aberrationen in der Metaphaseplatte einen möglichst spannungsfreien Zustand einnehmen, sollen bei X-förmigen Translokationsfiguren die Chromatiden nahezu im rechten Winkel zueinander abgebogen sein, bei U-förmigen erscheinen die Chromosomenschenkel dagegen mehr als "durchhängende Seile". Aus der Abb. 5 ist jetzt ersichtlich, daß ein symmetrisch, X-förmiges Interchange polarisiert, ein S U nicht polarisiert sein muß. Ganz entsprechend kann man auch die asymmetrischen RB' weiter unterteilen.

Auf Reunionsvorgänge zwischen einem Isochromatidbruch und einem einfachen Bruch lassen sich die Triradiale (RB'B") zurückführen. Hierbei entsteht gleichzeitig ein Isochromatidfragment,

welches häufig noch eine deutliche Lagebeziehung zu dem Triradial aufweist (Abb. 6 und 7). Derartige Umbauten treten wesentlich seltener auf als die zuvor beschriebenen Translokationen und wurden bei der quantitativen Auswertung mit diesen als RB' zusammengefaßt.

Der Schädigungsgrad einzelner Metaphaseplatten innerhalb einer Kultur kann recht unterschiedlich sein; es treten jedoch alle Zwischenstufen auf. Bereits stark zerstört sind die Chromosomen in Abb. 8 und 9. Die vielen Translokationen zeigen jedoch, daß Reparierungsprozesse noch ablaufen können. Das cytologische Bild der Zelle von Abb. 11, deren Chromosomen weitgehend zerstückelt sind, liefert dagegen keinen Hinweis mehr für derartige Repairvorgänge. Ein Übergangsstadium ist in Abb. 10 festgehalten.



Abb. 6

Metaphaseplatte, die neben anderen Schädigungen auch ein Triradial aufweist. Erklärung der Abkürzungen s. S. 94. (Versuchsserie A: $2,5 \times 10^{-7}$ Mol Trenimon, 24 Stunden)



Abb. 7

Metaphaseplatte mit einem Triradial und einem Isochromatidbruch (s. Pfeil). (Versuchsserie C; $\Delta t_2 = 24$ Stunden, Vergrößerung rd. 2000 x)



Abb. 8

Metaphaseplatte mit vielen Schädigungen, insbesondere zahlreichen Reunionsfiguren. Sie enthält zudem vier der sonst sehr selten auftretenden Schwesterstrangreunionen (s. Pfeil) und als Ausnahmefall ein dizentrisches Chromosom (s. Pfeil).

(Versuchsserie A: 5×10^{-7} Mol. Trenimon, 24 Stunden. Vergrößerung rd. 2000 x).

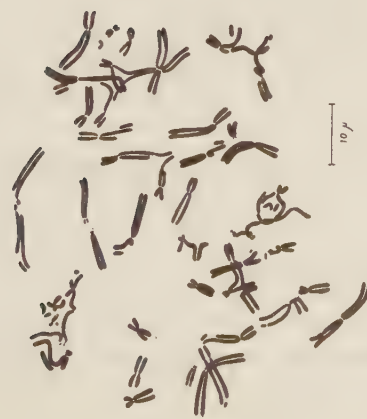


Abb. 9

Metaphaseplatte mit vielen Schädigungen, insbesondere zahlreichen Reunionsfiguren. (Versuchsserie A: 5×10^{-7} Mol Treimonon, 24 Stunden)



Abb. 10

Metaphaseplatte mit vielen Schädigungen, aber nur einer sicher erkennbaren Reunionsfigur (s. Pfeil). (Versuchsserie C: $\Delta t_2 = 12$ Stunden)



Abb. 11

Metaphaseplatte, die aus weitgehend zerstückelten Chromosomen besteht. (Versuchsserie A: 5×10^{-7} Mol Treimonon, 24 Stunden)

2. Häufigkeiten der Translokationstypen

Nachdem auf S. 20 eine Beschreibung und Klassifizierung der verschiedenen Translokationen vorgenommen wurde, soll im folgenden auf die Häufigkeiten der einzelnen Formen eingegangen werden (Abb. 12). Hierzu wurden zunächst die von den Fotos abgezeichneten Aberrationen in symmetrische bzw. asymmetrische eingeordnet, wobei noch vollständige (C = complete), bei denen alle vier Bruchenden verheilt waren, und unvollständige (I = incomplete) unterschieden wurden.

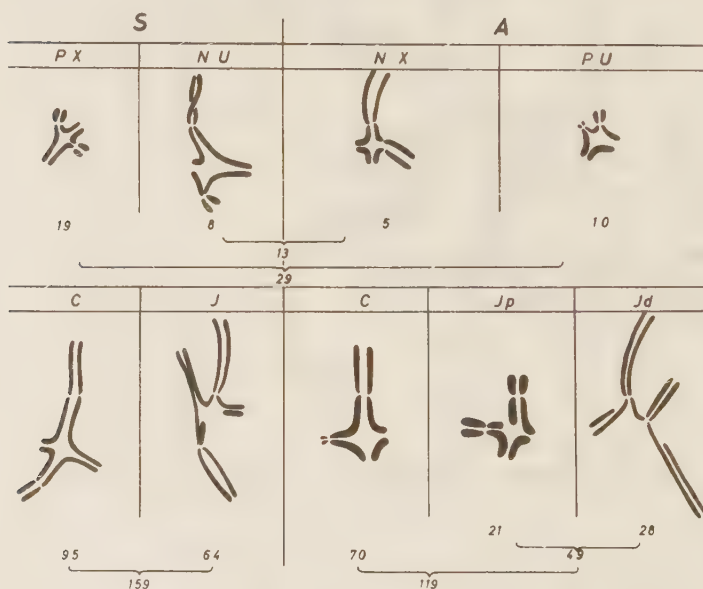


Abb. 12

Verschiedene Translokationstypen, die nach Einwirkung von Trenimon an menschlichen Chromosomen auftreten, und deren Häufigkeiten.

Erklärung der Abkürzungen s. S. 94

Von insgesamt 278 Translokationen waren 159 (57,2 %) S und 119 (42,8 %) A. Für ein 1:1 Verhältnis spricht eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,015$.

Der Anteil der unvollständigen Formen betrug für die symmetrischen 40,3 %, für die asymmetrischen 41,2 %; der relative Anteil stimmt in beiden Fällen also gut überein ($P = 0,88$). Insgesamt ergibt sich ein Verhältnis von C : I wie 1,46 : 1.

Bei den asymmetrischen Translokationen lassen sich noch die unvollständig proximalen (I_p), insgesamt 21, von den unvollständig distalen (I_d), insgesamt 28, unterscheiden. Für die Annahme, daß beide gleich häufig sind, beträgt die Wahrscheinlichkeit $P = 0,32$.

Die Hauptschwierigkeit bei der Interchangeanalyse besteht darin, die polarisierten von den nicht-polarisierten, d.h. die X- von den U-förmigen zu trennen. Um mögliche zusätzliche Fehlerquellen auszuschalten (s.S.65), wurden bei der Auswertung nur vollständige Translokationen erfaßt, bei denen keine Reunion zwischen einem langen und einem kurzen Arm eingetreten war und deren Bruchstellen nicht zu weit distal oder proximal lagen. Dadurch wird die Gesamtzahl auf 42 eingeeengt. Mit einer Wahrscheinlichkeit P von 0,78 ist das Verhältnis von P : N für die symmetrischen und asymmetrischen gleich, so daß sich insgesamt gut doppelt so viel polarisierte Interchange (insgesamt 29) wie nicht polarisierte (insgesamt 13) ergeben.

3. Versuchsserie A: Das Aberrationsmuster in Abhängigkeit von der zugesetzten Dosis

Jeweils 24 Stunden vor der Aufarbeitung wurde den Kulturen Trenimon in verschiedenen Konzentrationen hinzugesetzt, wobei die höchste Dosis (10×10^{-7} Mol) 40mal stärker als die niedrigste ($0,25 \times 10^{-7}$ Mol) war.

Einen Eindruck von der cytostatischen Wirkung vermittelt der Verlauf des Mitoseindex (MI) (Tab. 1 und 2; Abb. 13). Auch wenn man berücksichtigt, daß die Streuung der Werte, sowohl innerhalb der Kontrollen wie auch innerhalb der behandelten Kulturen zum Teil zu signifikanten Differenzen führt ($P < 0,01$), zeigt sich doch deutlich ein Abfall der Mitoserate bis hin zur stärksten Konzentration, bei der sich unter 4 000 Zellen keine mehr in Teilung befand.

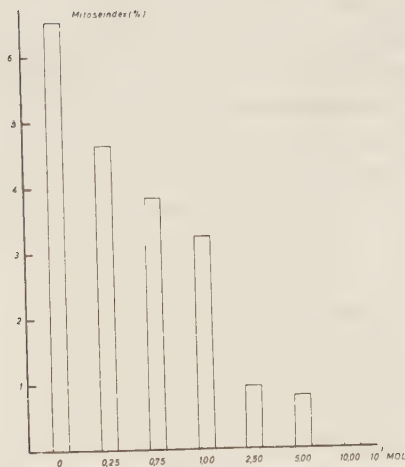


Abb. 13

Versuchsserie A: Mitoseindex in Abhängigkeit von der zugesetzten Trenimon-dosis

Parallel zur Abnahme der Mitoserate steigen aber die verschiedenen Aberrationstypen mit zunehmender Trenimonkonzentration an (Abb. 14). Das heißt, cytostatische Wirkung und Mutagenität sind positiv miteinander korreliert. Spontan treten mehr Läsionen auf als Brüche; Isochromatidbrüche sind sehr selten, und Translokationen wurden in den 950 Kontrollplatten gar nicht gefunden.

In dem Konzentrationsbereich von $0,25$ bis $2,5 \times 10^{-7}$ Mol erfolgt eine offensichtlich lineare Zunahme der Brüche und Läsionen (Abb. 14). Der Anstieg bis $5,0 \times 10^{-7}$ Mol ist etwas geringer, was auf einen Sättigungseffekt hindeutet. Ähnlich, nur weniger ausgeprägt, verhalten sich die Isochromatidbrüche. Die Brüche sind nicht nur prozentual am häufigsten, sondern zeigen auch die stärkste Zuwachsrates. Einen anderen Charakter hat der Kurvenverlauf für die Translokationen. Es scheint, daß dieser durch eine exponentielle Funktion zu beschreiben ist, da der Anstieg mit zunehmender Substanzmenge unverhältnismäßig stärker erfolgt. Wesentlich deutlicher kommt dies zum Ausdruck, wenn man nicht die

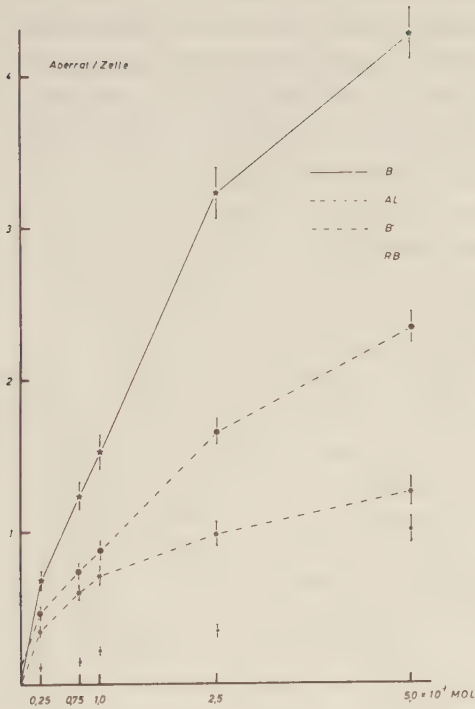


Abb. 14

Versuchsserie A: Anzahl der Schädigungen pro Zelle in Abhängigkeit von der zugesetzten Trenimonodosin.
Erklärung der Abkürzungen s.S. 94

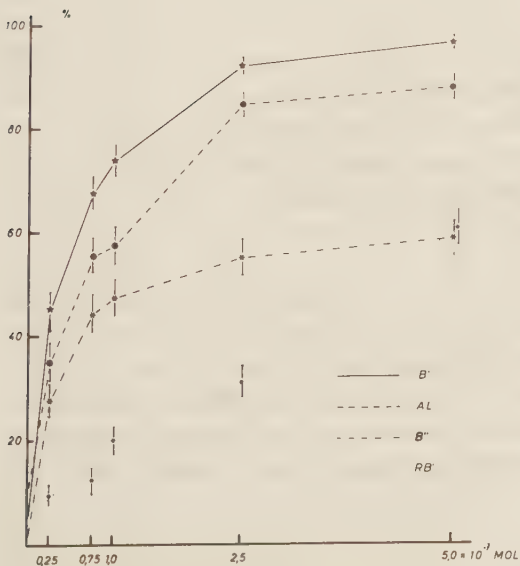


Abb. 15

Versuchsserie A: Prozentsatz an geschädigten Zellen in Abhängigkeit von der zugesetzten Trenimonodosin.
Erklärung der Abkürzungen s.S. 94

Absolutzahlen sondern den Prozentsatz der jeweils geschädigten Zellen betrachtet (Tab. 4, Abb. 15). Die Häufigkeitskurven der Brüche, Läsionen und Isochromatidbrüche zeigen offensichtlich Sättigungscharakter, dagegen wird die Zuwachsrate an Zellen mit Translokationen bei steigender Trenimondosis sogar noch größer.

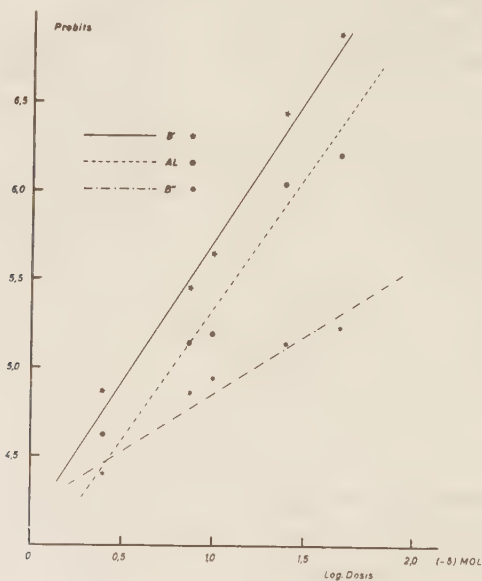


Abb. 16

Versuchsserie A: Vergleich der durch Brüche (B'), Läsionen (AL) oder Isochromatidbrüche (B'') geschädigten Zellen mit den dazugehörigen Probitgeraden bei logarithmischer Dosenskala.

Nimmt man eine Transformation von der linearen zur logarithmischen Dosenskala vor und teilt die Ordinate in Probits ein (Tab. 5; Abb. 16), so werden die Häufigkeitskurven der B', AL und B'' zu Geraden gestreckt. Auffallend ist der übereinstimmende Steigungswinkel für die Brüche und Läsionen, während die Isochromatidbrüche wesentlich langsamer zunehmen. Wie zu erwarten war, läßt sich

hierbei für die Translokationen keine - ihren Verlauf charakterisierende - Regressionsgerade berechnen ($P = 0,003$).

4. Versuchsserie B: Das Aberrationsmuster in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe

Die Auswertung der Versuchsserie^A hatte ergeben, daß nach Zugabe von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol Trenimon von 200 Metaphasen praktisch jede mindestens eine Schädigung aufwies. Diese Konzentration wurde als besonders geeignet für die folgenden Versuche gewählt, in denen das Aberrationsmuster der Substanz bei zeitlich unterschiedlicher Applikation (2 bis 40 Stunden vor Aufarbeitung) festzustellen war.

Da das Colcemid regelmäßig vier Stunden vor der Aufarbeitung hinzugesetzt wurde, sammelten sich bei dem Versuch mit der kürzesten Behandlungsdauer (Substanzzugabe 2 Stunden vor der Aufarbeitung) bereits zwei Stunden lang Mitosen an, bevor das Trenimon zur Einwirkung kam. Von 290 untersuchten Metaphaseplatten war rund die Hälfte (152) zum Teil stark geschädigt, während der Rest - den Kontrollen entsprechend - keine oder nur eine Aberration aufwies. Zur quantitativen Auswertung wurden, wie allgemein in dieser Serie, nur 100 Zellen herangezogen, die in der Reihenfolge ihres Auftretens von den 152 abgetrennt wurden.

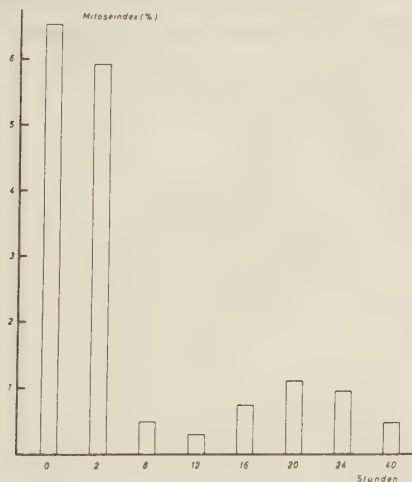


Abb. 17

Versuchsserie B: Mitoseindex in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe einer Trenimondosis von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol.

Der Mitoseindex liegt bei diesem Termin sehr hoch und unterscheidet sich praktisch nicht von dem der Kontrollen (Tab. 6, Abb. 17). Er fällt mit zunehmender Behandlungsdauer steil ab und erreicht nach einem kleinen Anstieg bei 40stündiger Einwirkungszeit der Substanz wieder einen Wert, der dem der 8-Stunden-Kultur entspricht. Zu berücksichtigen ist, daß auch hier wie in den Versuchen der Serie A, unabhängig von der Streuung der Mitoseindices, deren arithmetische Mittelwerte eingetragen wurden.

Bei der Betrachtung der Anzahl der verschiedenen Aberrationstypen pro Zelle (Tab. 7, Abb. 18) fällt sofort das gegensätzliche Verhalten der Brüche und Läsionen auf. Im 2-Stunden-Termin werden weit mehr Läsionen als Brüche induziert (Abb. 20 und 21). Deren Anteil geht zunächst rasch zurück, zeigt aber zwischen 24- und 40stündiger Einwirkungszeit keine statistisch zu sichernde Abnahme mehr. Die Brüche hingegen steigen ständig an, zuerst stark, dann schwächer. Isochromatidbrüche treten signifikant erhöht schon zwei Stunden nach der Trenimonzugabe auf, die ersten Translokationen 6 Stunden später. Beide nehmen langsam, aber relativ gleichmäßig zu. Ein Vergleich der Häufigkeitskurven (Abb. 19) ergibt, daß dieser Anstieg insbesondere darauf beruht, daß die Zahl derart geschädigter Zellen zunimmt. Dagegen verändert sich vom 8-Stunden-Termin an die absolute Zahl der Brüche und Läsionen aufweisenden Metaphasen praktisch nicht mehr, wohl aber deren Schädigungintensität.

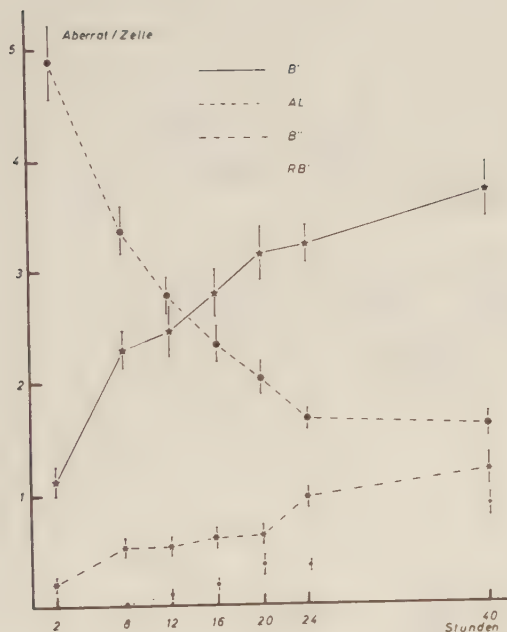


Abb. 18

Versuchsserie B: Die Anzahl der Schäden pro Zelle in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe einer Trenimondosis von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol.

Erläuterung der Abkürzungen s. S. 94

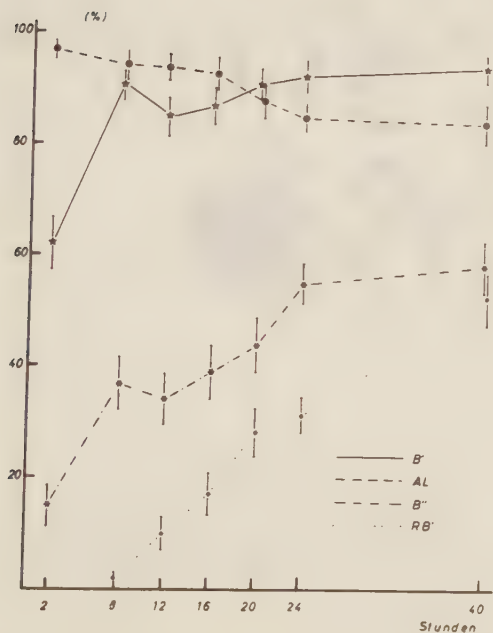


Abb. 19

Versuchsserie B: Prozentsatz der geschädigten Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe einer Trenimondosis von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol.

Erklärung der Abkürzungen s. S. 94



Abb. 20



Abb. 21 (Vergrößerung 2000 x)

Abb. 20/21: Charakteristisches Schädigungsbild nach 2-stündiger Einwirkungszeit einer Trenimondosis von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol.

Die Pfeile weisen auf Läsionen hin.

5. Versuchsserie C: Zur Frage der Einwirkungsdauer

In den Serien A und B blieb das Trenimon - entsprechend der Applikation in vivo - bis zur Aufarbeitung in der Kultur. Von Interesse ist daher neben der theoretisch möglichen Einwirkungszeit die tatsächliche Einwirkungsdauer. Für die vorliegende Fragestellung ist es dabei nebensächlich, ob das unveränderte Mutagen selbst oder irgendwelche wirksamen Folgerprodukte noch zugegen sind.

Der Versuchsansatz wurde bereits beschrieben (s.S. 9). Die hohe Anfangskonzentration von 1×10^{-6} Mol Trenimon in der Kultur I unterbindet die Zellteilung praktisch vollständig (Abb. 13), so daß nach 24-stündiger Einwirkungszeit keine Metaphasen mehr zu finden sind. Ein großer Teil der Interphasekerne sah klein und pyknotisch aus. Da zudem ihre Anzahl im Vergleich zu den Kontrollen niedriger zu sein scheint, ist anzunehmen, daß einige bereits zerfallen sind. Durch Zugabe des Inhaltes des zweiten Kulturfläschchens nach wechselnden Zeitabständen (Δt_2) wird die Trenimonmenge auf die Hälfte verdünnt, falls sie noch nicht an Wirksamkeit abgenommen hat, nämlich auf 5×10^{-7} Mol. Bei dieser Konzentration treten normalerweise bereits Mitosen auf. Zu beachten ist bei diesen neuen Experimenten, daß die Zellen der ersten Kultur zwar den Mitoseindex, nicht jedoch die Anzahl der geschädigten Platten beeinflussen.

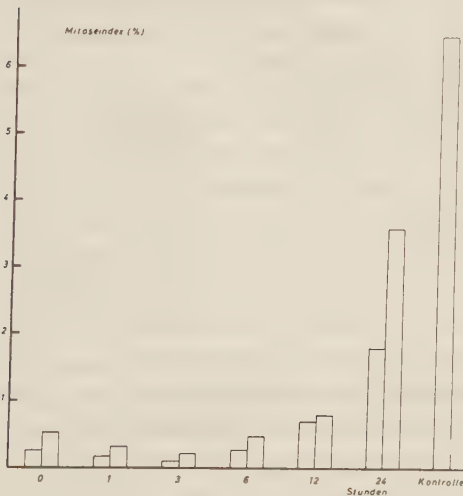


Abb. 22

Versuchsserie C:
Mitoseindex nach Trenimonbehandlung in Abhängigkeit der Dauer von Δt_2 (Erklärung s. Text)

Da für Δt_2 von 1 und 3 Stunden der Mitoseindex noch niedriger liegt als in den mit $5,0 \times 10^{-7}$ Mol Trenimon behandelten Kontrollen ($\Delta t_2 = 0$), ist während dieser Zeit die Wirksamkeit der Substanz offensichtlich noch nicht nachweisbar zurückgegangen (Tab. 9, Abb. 22). Nach 12 und 24 Stunden dagegen hat der cyto-statische Effekt deutlich abgenommen. Eine sichere quantitative Aussage läßt sich hieraus jedoch nicht treffen, da auch in dieser Versuchsserie die Schwankungen des Mitoseindex zum Teil recht erheblich waren. Daher wurde weiter das Schädigungsmuster der Mitosen aus den Versuchen mit Δt_2 von 6, 12 und 24 Stunden bestimmt und mit der Dosis-Effekt-Kurve der Serie A verglichen. Zur Vereinfachung wurden die Aberrationen nicht einzeln sondern gemeinsam erfaßt (Tab. 10). Die Translokationen wurden hierbei doppelt gezählt, da sie im Sinne der klassischen Bruch-Reunions-Hypothese 2-Treffer-Ereignisse darstellen, die Brüche und Läsionen nur einfach. Unsicher in dieser Beziehung ist die Beurteilung der Isochromatidbrüche, die daher nicht berücksichtigt wurden.

Da die Häufigkeiten dieser verschiedenen Chromatidaberrationen außer von der Konzentration auch von der Einwirkungszeit abhängen (vgl. Abb. 18), die gemeinsame Inkubationsdauer (Δt_3) aber nicht 24 Stunden wie bei der Vergleichsserie, sondern 16, 18 und 20 Stunden betrug, mußte zuvor eine Umrechnung erfolgen (s. Tab. 10). Hierzu wurden die Werte des 16- und 20-Stunden-Versuches der Serie B benötigt. Der Korrekturfaktor in der folgenden Tabelle gibt an, um wieviel die Aberrationsausbeute in diesen Kulturen von der des 24-Stunden-Termins abweicht.

Einwirkungszeit von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol Trenimon (Stunden)	B' + AL + 2 x RB'	Korrekt. Faktor
24	560	1,00
20	594	0,94
18	-	0,975 (inter- pol.)
16	554	1,01

In Abb. 23 ist das Ergebnis dieser Untersuchung graphisch dargestellt. Die Vergleichskonzentrationen ($5,0$; $2,5$; $1,0 \times 10^{-7}$ Mol) wurden hierfür mit ihrem einfachen mittleren Fehler parallel zur Abszisse eingetragen.

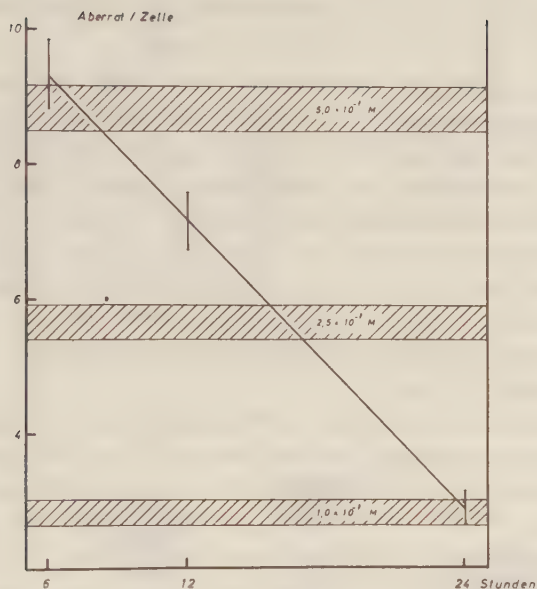


Abb. 23

Abnahme der Wirksamkeit des Trenimon
in Abhängigkeit der Dauer von Δt_2
(Erklärung s. Text).

Nach einem Δt_2 von 6 Stunden kann noch kein Nachlassen der Mutagenität des Trenimon festgestellt werden. Die durchschnittliche Zahl der Aberrationen pro Zelle liegt sogar noch etwas über dem Wert der behandelten Kontrolle. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Mit zunehmendem Zeitintervall Δt_2 geht dann aber die Wirksamkeit kontinuierlich zurück und beträgt nach 24 Stunden nur noch rund 20 % ($1 \times 10^{-7} \text{ Mol}$) der theoretischen Anfangskonzentration ($5 \times 10^{-7} \text{ Mol}$).

Was sich bereits bei einem Vergleich der Mitoseindizes andeutete, hat sich somit bestätigt: mit der gewählten Versuchsanordnung ist es nicht möglich, eine Abnahme des cytostatischen oder mutagenen Effektes des Trenimon oder eines Folgeproduktes innerhalb von 6 Stunden festzustellen. Nach 24 Stunden dagegen ist die Wirksamkeit auf etwa ein Fünftel zurückgegangen.

6. Versuchsserie D: Autoradiographische Untersuchungen
zur Veränderung des Markierungsmusters nach 8-stündiger
Einwirkung

Im Verlaufe dieser Arbeit trat die Frage auf, ob nach 8-stündiger Einwirkungszeit des Trenimon Metaphasen ausgewertet wurden, die noch in der Synthesepriode dem Mutagen ausgesetzt waren. Die autoradiographischen Experimente hierzu, bei denen - unter sonst gleichen Bedingungen - zusammen mit dem Trenimon ^3H -Thymidin hinzugesetzt wurde, ergaben 18,5 % markierte Metaphasen. Im Vergleich dazu hatten 70,1 % der Mitosen aus den entsprechenden Kontrollen das Thymidin eingebaut (Abb. 24 und 25). Der Unterschied im Markierungsmuster zwischen diesen beiden Versuchen ist hoch signifikant ($P < 10^{-10}$).

Um sicher zu gehen, daß diesem Unterschied auch zeitlich gesehen eine Bedeutung zukommt, ist es erforderlich zu wissen, wie rasch der Übergang der Zellen von der S- in die G_2 -Phase erfolgt. Zur Prüfung dieser Frage wurden zwei weitere unbehandelte Kulturen autoradiographisch untersucht, denen wie bisher das ^3H -Thymidin 8 Stunden, das Colcemid jedoch nicht 4, sondern 5 und 6 Stunden vor der Aufarbeitung hinzugefügt wurde.

Erwartungsgemäß ergab sich, daß je später die Colcemidzugabe erfolgt, desto höher der Anteil an markierten Metaphasen ist (Tab. 11). Die Probitgerade (Abb. 26), die sich für diese 3 Kontrollpunkte berechnen läßt, zeigt einen signifikanten Anstieg ($P < 10^{-4}$), verläuft aber in so großem Abstand zu dem einen Trenimonwert, daß man, ohne eine entsprechende Gerade für die mit Trenimon behandelten Kulturen bestimmt zu haben, sagen kann, daß dem Unterschied im Markierungsgrad auch eine Verschiebung auf der Zeitachse entspricht. Das würde aber heißen, daß nach einer Trenimonzugabe von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol die durchschnittliche Dauer der G_2 -Phase verlängert wird.



Abb. 24

Metaphaseplatte mit Replikationsmuster der späten Syntheseperiode.
(Vergrößerung rd. 2000 x).

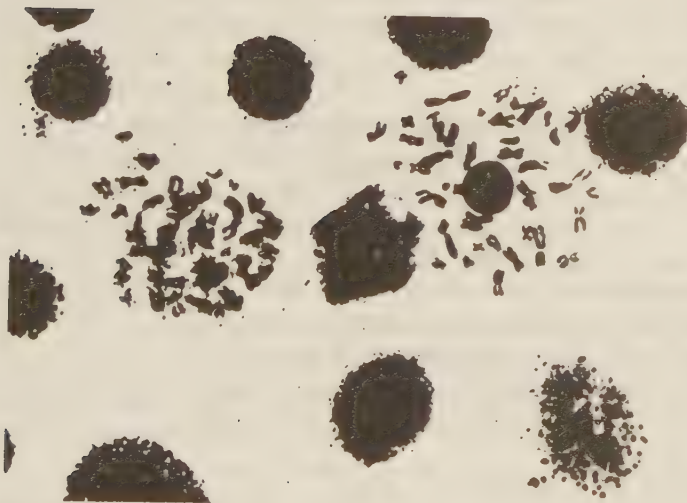


Abb. 25

Übersichtsbild, welches Interphasekerne mit unterschiedlichem Markierungsgrad zeigt, sowie zwei Mitosen, von denen eine kein ^3H -Thymidin eingebaut hat (Vergrößerung rd. 1000 x).

Versuchsserie D; ^3H Td R: $1\mu\text{C}$ pro ml Medium; spez. Aktiv. $5,0\text{ C pro m Mol}$, 8 Stunden; Colcemid: 4 Stunden, Exposition: 4 Tage.



Abb. 26

Versuchsserie D: Vergleich der Häufigkeit (in Probits) markierter Mitosen einer trenimonbehandelten Kultur und dreier Kontrollen, die sich in der Dauer der Colcemideinwirkung (h) unterscheiden.

Nähere Erläuterungen s. Text.

7. Interzelluläre Verteilung der Aberrationen

Man kann davon ausgehen, daß der Kontakt mit dem Mutagen für alle Zellen gleich wahrscheinlich ist, denn nach Zugabe der aufgelösten Substanz wurde durch gründliches Umschütteln dafür gesorgt, daß sich das Agens homogen in der Kulturflüssigkeit verteilen konnte. Die Zahl der Metaphasen ohne Schädigung, mit einer oder mehreren Aberrationen sollte sich dann mit einer Poissonverteilung beschreiben lassen.

ben lassen, sofern nicht sekundäre Prozesse diese Verhältnisse verschieben.

Die interzelluläre Verteilung (Tab. 12) der Läsionen (Abb. 28) stimmt am besten mit der Zufallsverteilung überein. Signifikante Abweichungen davon treten für die Brüche (Abb. 27) und die Isochromatidbrüche (Abb. 29) bei den höheren Konzentrationen auf. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, lassen sich diese darauf zurückführen, daß Zellen mit wenig oder aber sehr vielen Schädigungen relativ zu häufig anzutreffen sind. Dies zeigt sich übereinstimmend auch bei den niederen Dosen. Es gilt gleichermaßen auch für die Translokationen, nur daß hier die Unterschiede statistisch nicht zu sichern sind. Zudem läßt sich feststellen, daß die Klassen mit keinen oder wenigen Brüchen, die in Bezug auf die theoretische Erwartung zu häufig besetzt sind, in charakteristischer Weise mit der angewandten Substanzmenge zunehmen. So ist bei $0,25 \times 10^{-7}$ Mol nur die 0-Klasse zu stark besetzt, bei der 10fachen Konzentration sind es die ersten beiden und bei $5,0 \times 10^{-7}$ Mol sogar die ersten vier.

Die gleiche Frage kann auch an dem Material der Serie B untersucht werden (Tab. 13; Abb. 30 u. 31). Die Zahl der ausgewerteten Mitosen ist dafür allerdings recht gering, so daß nur die Verteilung der häufigsten Schädigungstypen, der Brüche und Läsionen, zwischen den Zellen mit der Zufallskurve verglichen werden konnte.

Für die Brüche zeigt sich auch hier der gleiche Trend wie vorhin. In einem Versuch (2stündige Einwirkungszeit), bei dem die Zahl der Läsionen am höchsten war, ergeben diese ebenfalls die charakteristische und auch signifikante Abweichung von der Poissonverteilung. In den anderen Experimenten dieser Reihe ist dagegen die 0-Klasse zu selten besetzt, die 1-Klasse überrepräsentiert.

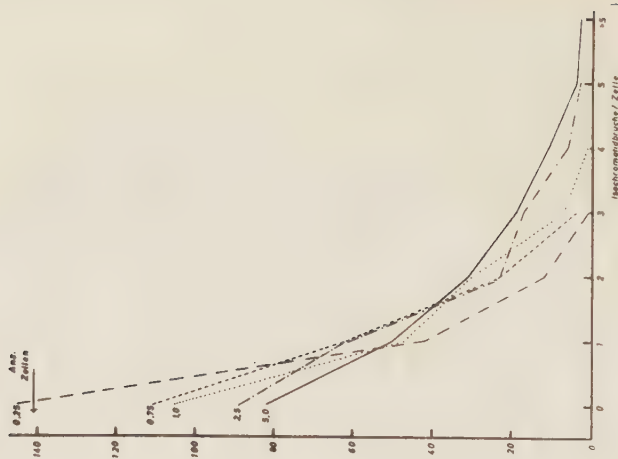


Abb. 27

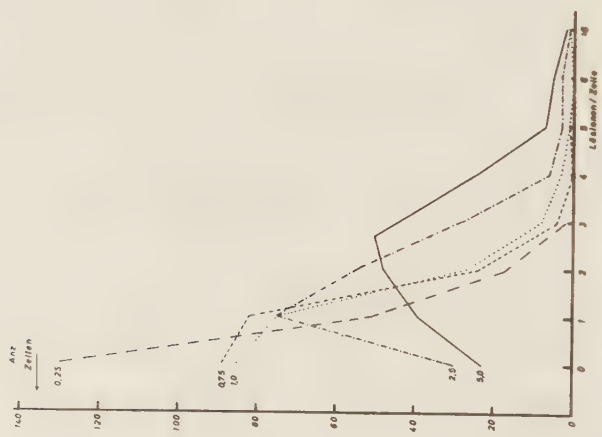


Abb. 28

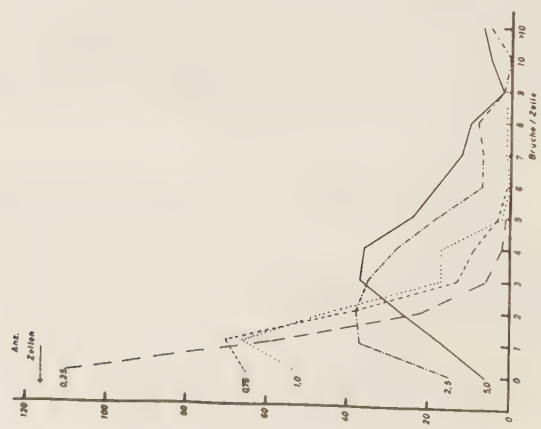


Abb. 29

Versuchsserie A: Interzelluläre Verteilung der Brüche, Läsionen und Isochromatidbrüche nach Zugabe unterschiedlicher Trenimondosen. (Angaben der Konz.: $\times 10^{-7}$ Mol). Für jeden Versuch wurden 200 Zellen ausgewertet.

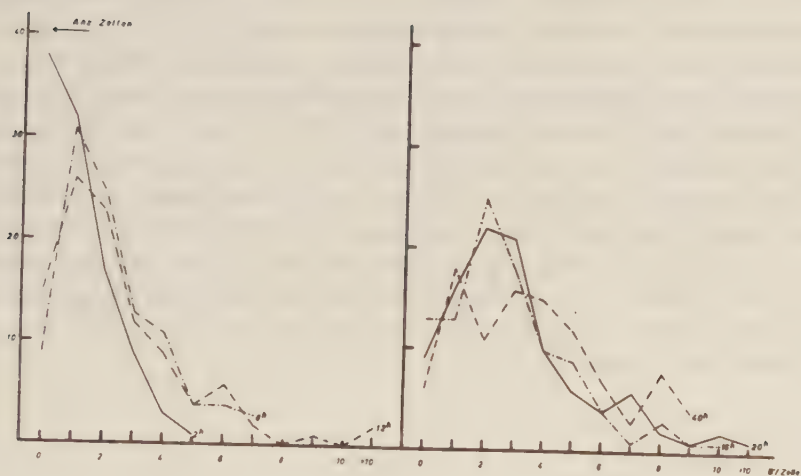


Abb. 30

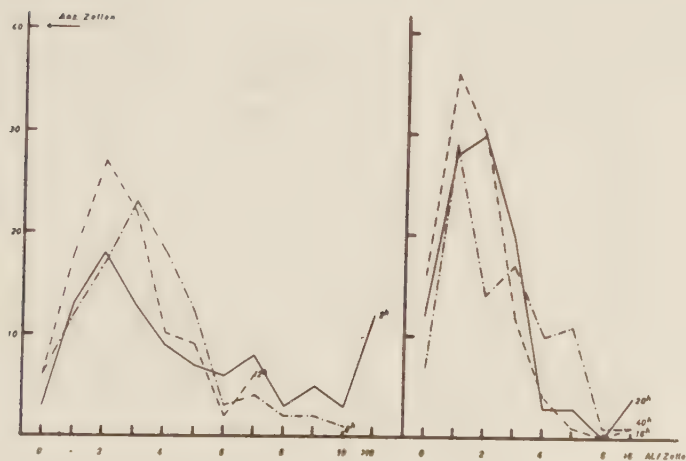


Abb. 31

Abb. 30/31: Versuchsserie B: Interzelluläre Verteilung der Brüche und Läsionen nach unterschiedlicher Einwirkungszeit einer Trenimondosis von $2,5 \times 10^{-7}$ Mol. Für jeden Versuch wurden 100 Zellen ausgewertet.

8. Interchromosomale Verteilung der Aberrationen

Die relative Metaphaselänge der einzelnen menschlichen Chromosomen wurde von mehreren Untersuchern bestimmt, die unter Kulturbedingungen, welche mit den hier angewandten vergleichbar sind, arbeiteten. Eine Zusammenstellung dieser Ergebnisse findet sich in einem Bericht der "Chicago Conference" (1966). Unter Zugrundelegung dieser Werte läßt sich nun feststellen, ob die Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen zufällig, d.h. ihrer relativen Metaphaselänge entsprechend, erfolgt, oder ob bestimmte Elemente etwa bevorzugt geschädigt wurden. Um dies zu prüfen, wurden die von Mikrofilmen abgezeichneten Chromosomen, die Brüche oder Läsionen aufwiesen bzw. an Translokationen beteiligt waren, den auf S.12 angegebenen Gruppen zugeordnet.

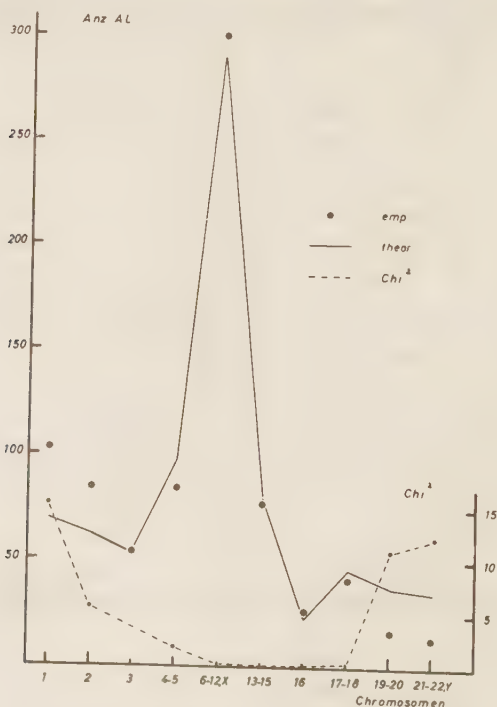


Abb. 32

Vergleich der interchromosomalen Verteilung der Läsionen (AL) mit der theoretischen Kurve, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt.

Als erstes zeigte sich, daß die 500 Läsionen, die nach 2stündiger Einwirkungszeit des Trenimon auftraten, die gleiche Verteilung aufwiesen wie die 300 des 24-Stunden-Termins ($P = 0,96$; Tab. 14). In beiden Fällen sind die großen Chromosomen 1 u. 2 relativ zu häufig, die Gruppen 19 - 20 und 21 - 22, Y dagegen zu selten betroffen. Insgesamt ergibt sich dadurch jeweils ein deutlicher Unterschied gegenüber den theoretischen Werten, der statistisch signifikant ist, wenn alle 800 Läsionen gemeinsam betrachtet werden (Tab. 14, Abb. 32). Wie aus der Tab. 16 ersichtlich ist, zeigen aber nicht nur die kleinen Elemente sondern auch die kurzen Arme der Chromosomen 2, 4-5 und 6 - 12, X zu wenig Läsionen ($P \ll 0,001$).

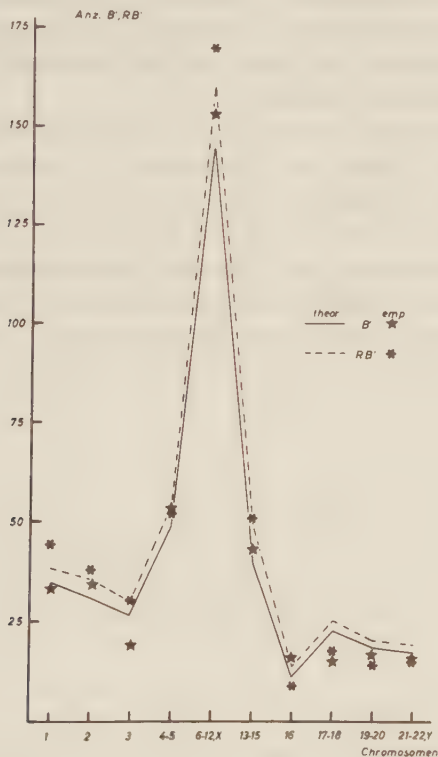


Abb. 33

Vergleich der interchromosomalen Verteilung der Brüche (B') und Translokationen (RB') mit der theoretischen Kurve, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt.

Im Gegensatz hierzu stimmen Erwartung und Befund für die Verteilung der 400 Brüche (Einwirkungszeit des Trenimon 24 Stunden) auf die Chromosomengruppen gut ($P = 0,56$; Tab. 15, Abb. 33), auf lange und kurze Arme angenähert überein ($P = 0,005$, Tab. 16). Ebenso sind die verschiedenen Chromosomen an der Entstehung der 221 identifizierbaren Translokationen ihrer relativen Metaphase-länge entsprechend häufig beteiligt ($P = 0,43$).

Dieses Material gibt zudem noch Aufschluß über die Häufigkeit der Kombinationen der einzelnen Chromosomen miteinander. Die Zusammenstellung in Tab. 17 zeigt, welche Abweichungen, abgerundet auf ganze Zahlen, von der theoretischen Erwartung sich für jede der 55 Paarungsmöglichkeiten ergeben. Für die statistischen Berechnungen (Tab. 18) mußten einige Gruppen zusammengefaßt werden, um genügend hohe Zahlen zu erhalten. Das Ergebnis ist in Abb. 34 graphisch dargestellt worden.

Allgemein kann man feststellen, daß sich die Chromosomen zufallsgemäß kombiniert haben. Nur die Gruppe 6 - 12,X stimmt mit dieser Annahme nicht so gut überein ($P = 0,006$). Diese Chromosomen sind offensichtlich etwas zu selten untereinander Reunionen eingegangen. Bemerkenswert ist, daß die Elemente 13 - 15 und 21 - 22, die in der Metaphase häufig assoziiert sind, sowie homologe Chromosomen keine erhöhte Translokationsrate miteinander zeigen.

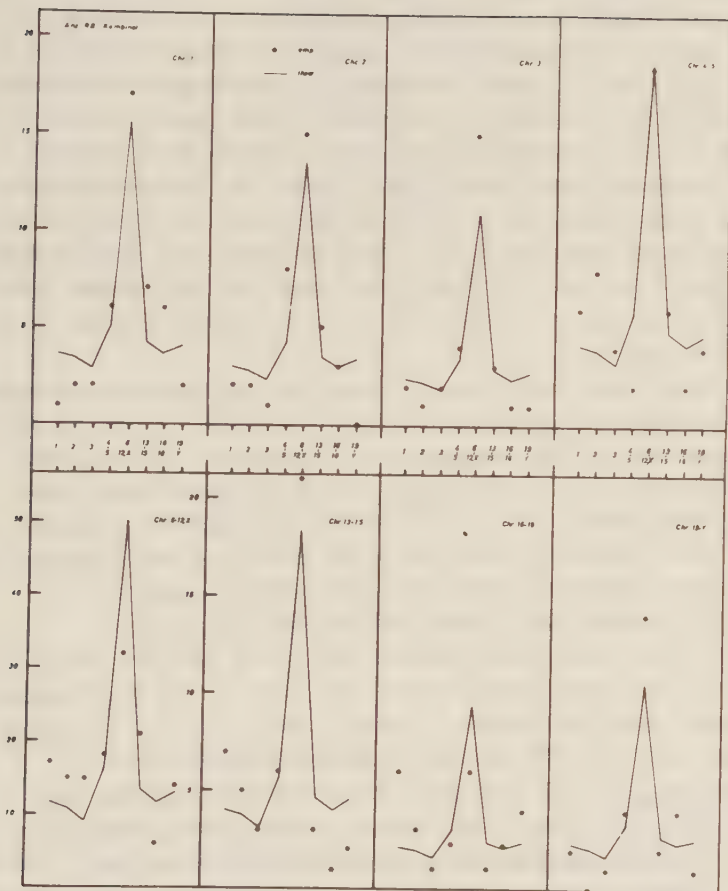


Abb. 34

Vergleich der empirischen Kombinationshäufigkeiten der Chromosomen bzw. Gruppen miteinander und der Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt.

9. Intrachromosomale Verteilung der Brüche und Läsionen

Das gleiche Material, an dem die interchromosomale Verteilung der Brüche und Läsionen untersucht wurde, diente auch dazu, die Lage der einzelnen Aberrationen auf den Chromosomen festzustellen. Die Messungen hierzu wurden an den gezeichneten Chromosomen mit Hilfe eines Stechzirkels durchgeführt. Als erstes wurde die Entfernung Centromer-Telomer der betroffenen Chromatide bestimmt und danach der Abstand zwischen Kinetochor und Schadenstelle. Der Quotient aus beiden ist ein Maß für die Lage der Aberration auf dem Chromosomenschenkel. Da die Läsionen eine gewisse Ausdehnung besitzen, wurde stets deren Mitte als Beziehungspunkt gewählt. Die genaue Lokalisation der Bruchstelle war nicht immer einfach, weil nicht nur eine Lage-, sondern auch eine Formveränderung des distalen Stückes erfolgen kann (Abb. 3). In diesen Fällen erleichtert häufig ein Vergleich mit der ungeschädigten Chromatide die Bestimmung.

Um spezielle Schädigungsmuster einzelner Chromosomenabschnitte auffinden zu können, ist deren sichere Identifizierung nötig. Dies ist praktisch nur für das Paar Nr. 2 möglich. Die meisten Elemente wurden bereits von vornherein gruppenweise erfaßt und bei den metazentrischen 1, 3 und 16 lassen sich die beiden Arme kaum voneinander unterscheiden. Damit das Material auch statistisch bearbeitet werden konnte, mußten zudem die Chromosomen 1 - 3, 16 - Y und alle kurzen Arme gemeinsam ausgewertet werden.

Mit Hilfe des Homogenitätstestes läßt sich zunächst zeigen, daß bezüglich der Verteilung der Läsionen nach 2- und 24stündiger Einwirkungszeit kein Unterschied besteht (Tab. 19). Diese wurden daher für die weiteren Berechnungen zusammen ausgewertet.

Übereinstimmend ergibt sich, daß die Brüche und Läsionen nicht gleichmäßig über die Chromatiden verteilt sind, sondern die meisten im distalen Abschnitt zu finden sind (Tab. 20; Abb. 35). Nur bei den kleinen Elementen und den kurzen Armen liegt das Maximum der Läsionen in der mittleren Region. Die Übereinstimmung im Verteilungsmuster der Brüche und Läsionen ist daher auch für die kurzen Arme am schlechtesten ($P = 0,0018$), sonst jedoch z.T. recht gut. Das zeigt sich ebenfalls, wenn man nur noch lange und kurze Abschnitte unterscheidet und diese, statt wie bisher

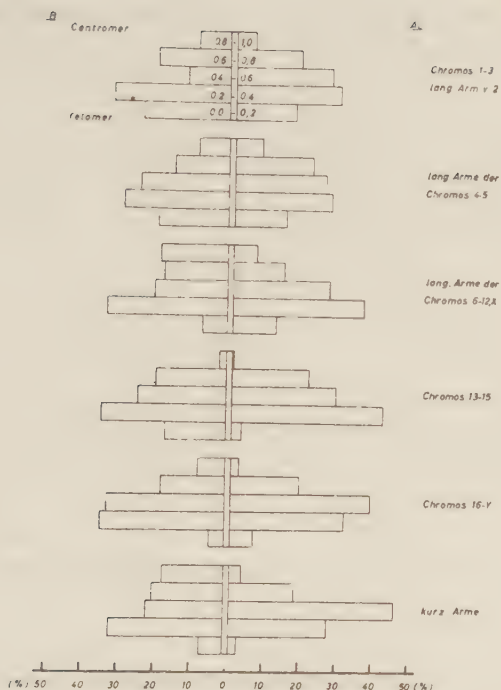


Abb. 35

Intrachromosomale Verteilung der Brüche (B') und Läsionen (AL).

in 5, in je 10 Untereinheiten gliedert (Tab. 21, Abb. 36).

Da die Werte auffallend gleichsinnig von einer zufälligen Verteilung abweichen und in der Regel eine eingipfelige Kurve ergeben, wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse mit einer Poissonkurve beschreiben lassen (Tab. 22 u. 23). Tatsächlich trifft dies für die meisten Gruppen zu; mit Einschränkungen allerdings für die Läsionen auf den kurzen Armen und die Brüche der Chromosomen 6 - 12,X. Ein signifikanter Unterschied tritt auf, wenn man sämtliche Läsionen und Brüche der langen Chromosomenschenkel betrachtet (Tab. 21). Allerdings zeigt die graphische Darstellung (Abb. 36), daß die Maxima der theoretischen und

empirischen Kurve für die Läsionen genau, für die Brüche recht gut übereinstimmen.

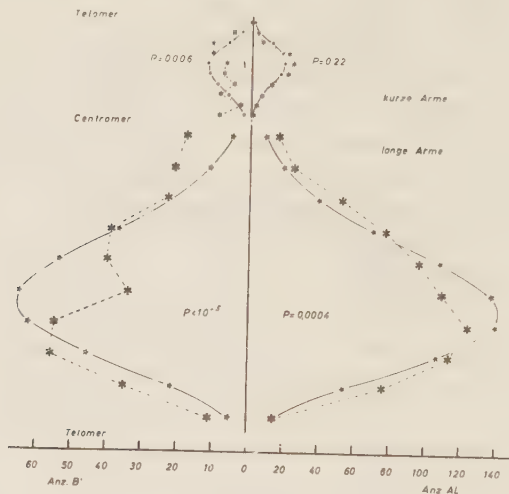


Abb. 36

Vergleich der empirischen Verteilung (gestrichelte Linie) mit der Poissonkurve (ausgezogene Linie) der Brüche (B') und Läsionen (AL) auf den langen und kurzen Armen der menschlichen Chromosomen.

Die bisherige Betrachtungsweise erlaubte es nicht, das individuelle Schädigungsmuster eines Chromosoms zu erfassen. Dies ist, aus den bereits angeführten Überlegungen, nur für das Paar Nr. 2 möglich (Tab. 24, Abb. 37). Die genaue Zuordnung der 34 Brüche und 84 Läsionen zeigt wieder die Häufung im distalen Bereich. Es ist nicht auszuschließen, das auch in einer Zone im proximalen Abschnitt des langen Schenkels vermehrt Schäden auftreten. Um dies zu klären, ist das Zahlenmaterial jedoch zu gering.

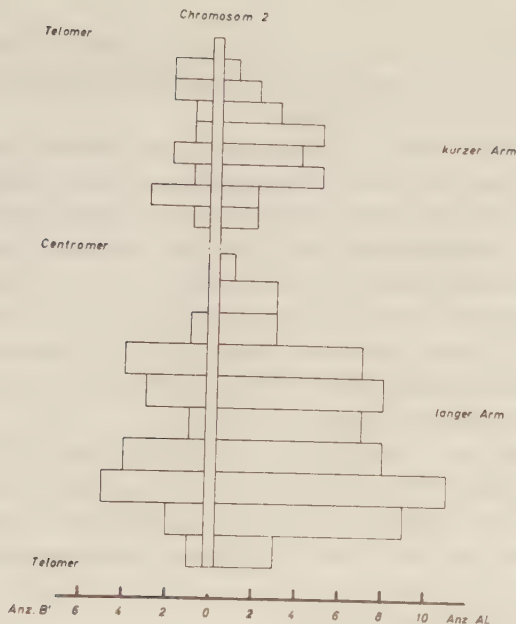


Abb. 37

Verteilung der Brüche (B') und Läsionen (AL) auf dem Chromosom Nr. 2

10. Korrelationsanalyse zum Schädigungsmuster der Zellen

Mittels einer Korrelationsanalyse soll im folgenden geprüft werden, ob sich die verschiedenen Schädigungstypen unabhängig voneinander auf die einzelnen Zellen verteilen oder ob bestimmte Aberrationen besonders häufig gemeinsam auftreten. An einem konkreten Beispiel erläutere die Frage: weisen Zellen mit vielen Brüchen auch eine überdurchschnittliche Anzahl von Läsionen auf?

Geht man davon aus, daß beide Veränderliche gleichwertig sind, so sollten die Punkte, die den Beobachtungsparen entsprechen, auf einer Geraden liegen, damit die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten (r) sinnvoll ist. Für jeweils beide Variable wurde daher die Regression auf Linearität geprüft. Die Wahrscheinlichkeit P dafür war nur bei einer der 35 Berech-

nungen kleiner als 0,001. Tab. 25 enthält die F-Werte für die Quotienten der Durchschnittsquadrate, die sich aus dem Material der Versuchsserie A ermitteln ließen.

Abb. 38 zeigt, daß eine eindeutig positive Korrelation für alle drei ausgewerteten Konzentrationen zwischen den Brüchen und den übrigen Aberrationen besteht. Es ist dagegen wenig wahrscheinlich, daß ein Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten der Läsionen und der Isochromatidbrüche vorhanden ist. Der Korrelationskoeffizient hierfür liegt in zwei Versuchen nur geringfügig über der Signifikanzgrenze, in einem sogar deutlich darunter. Statistisch nicht mehr sichern läßt sich eine Wechselwirkung zwischen den Läsionen und Translokationen.

Eine Abhängigkeit des Korrelationskoeffizienten von der zugegebenen Substanzmenge läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen, da der Verlauf der einzelnen Kurven recht unterschiedlich ist. Allerdings besitzt r in 4 der 5 Fälle bei der stärksten Konzentration ($5,0 \times 10^{-7}$ Mol) den höchsten Wert und bei 1×10^{-7} Mol dreimal den niedrigsten.

Eine entsprechende Analyse wurde auch mit dem Zahlenmaterial der Versuchsserie B durchgeführt (Tab. 26, Abb. 39). Grundsätzlich wird zunächst das oben dargelegte Ergebnis bestätigt: die Brüche sind in der Regel mit den anderen Aberrationen positiv korreliert, die Läsionen dagegen nur mit den Brüchen. Zugleich deutet sich aber an, daß die Wechselwirkung zwischen den Brüchen und den Isochromatidbrüchen mit zunehmender Einwirkungszeit der Substanz noch verstärkt, zwischen den Läsionen und den Isochromatidbrüchen dagegen weiter abgeschwächt wird.

Befand sich das Trenimon 40 Stunden in den Kulturen, ist auch die positive Korrelation zwischen den Brüchen und den Läsionen, die nach 12stündiger Einwirkungszeit anscheinend am höchsten ist, statistisch nicht mehr zu sichern.

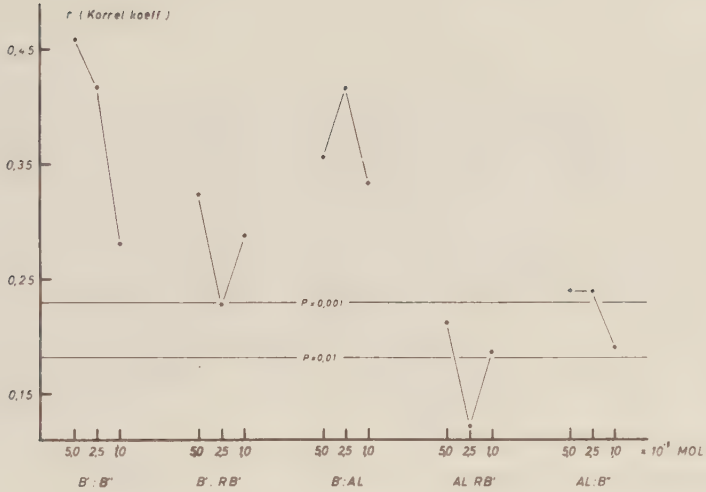


Abb. 38

Versuchsserie A: Korrelativer Zusammenhang der einzelnen Aberrationen miteinander für unterschiedliche Trenimonkonzentrationen

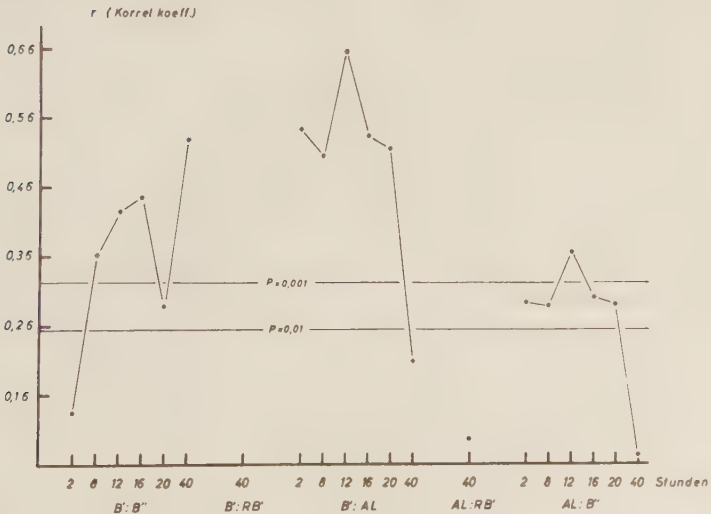


Abb. 39

Versuchsserie B: Korrelativer Zusammenhang der einzelnen Aberrationen miteinander nach Zugabe einer Trenimondosis von 2.5×10^{-7} Mol zu unterschiedlichen Zeiten

IV. Diskussion

=====

Zellzyklus

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß das Trenimon schwere Schädigungen an menschlichen Chromosomen verursacht, wobei die Wirksamkeit in den Kulturen nur langsam nachläßt. Diese Substanz stellt somit ein wirkungsvolles Mutagen dar. Zugleich muß sie als ein starkes Cytostatikum angesehen werden, da sie zu einem erheblichen Rückgang der Mitoserate führt und den Zellzyklus deutlich verlängert. Das quantitative und qualitative Schädigungsbild sowie das Ausmaß der Mitosedepression wiesen ferner eine deutliche Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substanzzugabe auf.

Der leitende Gesichtspunkt für die nun folgende Diskussion soll deshalb darin bestehen, die Ergebnisse in Beziehung zu dem Generationszyklus der Lymphocyten zu setzen, zumal hierüber an menschlichen Zellen bisher kaum Angaben zu finden sind. Die Befunde sollen aber nicht isoliert betrachtet, sondern mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen werden, die mit verschiedenen Substanzen am gleichen Objekt bzw. mit verwandten Agenzien an unterschiedlichen Testsystemen arbeiteten.

Als erstes muß zunächst der Frage nachgegangen werden, wieviele Teilungen die Zellen nach der Trenimonzugabe noch durchführten, bis sie in der Metaphase blockiert wurden. Da die Applikation der Substanz bei der Versuchsserie A 24 Stunden vor Abbruch der Kulturen erfolgte, die normale Generationsdauer der Lymphocyten etwa 20 bis 22 Stunden beträgt, kann man nicht von vornherein ausschließen, daß sich zumindest einige der Zellen während des Behandlungszeitraumes zum zweiten Male teilten.

Es ist jedoch erwiesen, daß durch die Einwirkung von Mutagenen, insbesondere so starker Cytostatika wie im vorliegenden Falle, die Dauer einzelner Stadien des Generationszyklus erheblich verlängert werden kann. Aus Versuchen an Vicia geht hervor, daß Substanzen, die Aberrationen in der S-Phase auszulösen vermögen, insbesondere diese verlängern (EVANS u. SCOTT 1964).

8-Äthoxy-koffein hingegen, das hauptsächlich die Zellen in der G₂-Periode schädigt, verlangsamt den Ablauf dieses Abschnittes (SCOTT u. EVANS 1964; KIHLMAN 1966). Da das Trenimon während der DNS-Replikation und in der postsynthetischen Phase Schäden

verursacht (s.S. 61), könnte man erwarten, daß es den Ablauf dieser beiden Stadien verzögert.

Aus dem Versuch mit 2stündiger Einwirkungszeit, bei dem das Colcemid wie üblich 4 Stunden zugegen war, geht allerdings hervor, daß die Dauer der späten G_2 -Phase nicht verändert wird. Die geschädigten Platten treten in etwa gleicher Häufigkeit wie die ungeschädigten auf (152 : 138). Das heißt aber, daß in den ersten beiden Stunden der Colcemideinwirkung angenähert ebenso viele Zellen in der Metaphase arretiert wurden wie in den letzten beiden, als zusätzlich noch Trenimon zugegen war. Der Mitoseindex dieser Kulturen unterscheidet sich daher praktisch nicht von dem der Kontrollen. Hierbei wird vorausgesetzt, daß die Zahl der pro Zeiteinheit in die Metaphase eintretenden Zellen wie bei einer asynchronen Zellpopulation annähernd gleich ist (vgl. S.16) und sämtliche Metaphasen durch das Colcemid blockiert und damit angesammelt werden (HABERMEHL u. DIEFENTHAL 1966). Auch wenn man berücksichtigt, daß erst mit dem Fixieren, also etwa eine halbe Stunde nach Aufarbeitungsbeginn, die Lymphocyten abgetötet werden, sich die beiden Zeitabschnitte also nicht genau wie 2 : 2 verhalten, ändert dies kaum etwas an dem Befund.

Nach 8stündiger Einwirkungszeit des Mutagens ist der Mitoseindex dagegen stark abgesunken. Die autoradiographischen Untersuchungen zeigten, daß die durchschnittliche Dauer der G_2 -Phase im Vergleich zu den Kontrollen deutlich verlängert ist. Dies könnte einmal darauf beruhen, daß der Ablauf der frühen G_2 -Phase verzögert wird oder zum anderen, daß die Zahl der aus der S- in die G_2 -Periode eintretenden Zellen verringert wird. Vermutlich spielen beide Effekte eine Rolle. Da in den Kontrollen 30 % der Zellen nicht markiert sind, der Mitoseindex in den behandelten Kulturen aber nicht auf etwa 30 % sondern auf weniger als 10 % der Kontrollen abgesunken ist, spricht dies für eine Verzögerung im Ablauf der G_2 -Phase, genauer der frühen G_2 -Phase, da die späte ja keine Veränderung zeigte. Zum anderen weist der mit zunehmender Einwirkungszeit des Mutagens anhaltend starke cytostatische Effekt daraufhin, daß auch die S-Phase in ihrem Ablauf erheblich gehemmt sein dürfte.

Ähnliche Ergebnisse erhielten BOOTSMAN u. HUMPHREY (1968) nach UV-Bestrahlung zweier Säugerzellstämme. Während sich die Behandlung auf die späte G_2 -Phase nicht auswirkte, wurde die frühe ebenso wie

die S-Periode verlängert. Die Mitoserate in menschlichen Lymphocytenkulturen war nach Mitomycinzugabe 1 Stunde vor der Aufarbeitung nicht, dagegen bei Applikation 24, 52 und 62 Stunden zuvor stark abgesunken (NOWELL 1964). PALME u. LISS, die nach Trenimonbehandlung von Mäusetumoren in vivo die DNS-Reduplikation untersuchten, stellten eine erhebliche Verzögerung im Ablauf der Synthesephase fest. Bei Vicia verdoppelt eine TEM-Konzentration von 5×10^{-4} Mol die Generationsdauer (NUTI-RONCHI et al. 1967).

Aus diesen Ergebnissen, die durch das gefundene Aberrationsmuster gestützt werden (s.S.61), kann geschlossen werden, daß in sämtlichen Versuchen die der Behandlung folgende Mitose erfaßt wurde. Geschah die Substanzzugabe 2 Stunden vor der Aufarbeitung, befanden sich alle ausgewerteten Zellen zum Zeitpunkt der Applikation in der G_2 -Phase, bei 8stündiger Einwirkungszeit waren es immer noch etwa 80 %. Der Anteil dieser Zellen verringert sich bei den längeren Behandlungsterminen, so daß in den 24-Stunden-Kulturen vermutlich der größte Teil der erfaßten Mitosen in der S-Phase geschädigt werden konnte, nach 40stündiger Einwirkungszeit sicherlich etliche in der G_1 -Periode.

Einwirkungsdauer

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die durch chemische Mutagene induzierten Aberrationstypen charakteristische qualitative und quantitative Veränderungen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substanzzugabe zeigen. Da in den Versuchsserien A und B das Agens bis zur Aufarbeitung in den Kulturen verblieb, ist bei der Interpretation dieser Ergebnisse die tatsächliche Einwirkungszeit, die Einwirkungsdauer, zu berücksichtigen.

Zur chemischen Beständigkeit des aufgelösten Trenimon wurde von BERG und HORN (1963) mitgeteilt, daß die hydrolytische Aufspaltung der Äthyleniminoringe mit fallendem pH zunimmt. Aus Untersuchungen von NUTI-RONCHI et al. (1967) geht hervor, daß das TEM, welches sich nur im Grundkörper vom Trenimon unterscheidet, nach 6stündiger Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$ in destilliertem Wasser nahezu die gleiche Anzahl von Aberrationen auslöst wie nach sofortiger Zugabe. Eine 18 Monate alte TEM-Lösung induzierte bei Vicia faba nur etwas weniger Chromosomenschäden als eine frisch zubereitete (OCKEY 1957). Es kann somit angenommen werden, daß auch das Trenimon - zumindest im zellfreien System - recht be-

ständig ist. Wie die Wirksamkeit des Trenimon in einer Zellkultur zurückgeht, wurde mit der auf S.9 beschriebenen Versuchsanordnung festgestellt. Dieses Verfahren ist recht empfindlich, da die Substanz bereits in geringen Konzentrationen die Chromosomen schädigt bzw. den Mitoseindex senkt.

Für die ersten 6 Stunden läßt sich kein Verlust an cytostatischer Wirkung nachweisen (Abb. 22). Der Mitoseindex der 1- und 3-Stunden-Serie liegt sogar noch unter dem der behandelten Kontrollen. Dies dürfte darauf beruhen, daß der relative Anteil der Mitosen der zweiten Kultur durch die nicht mehr teilungsfähigen Zellen der ersten verringert wird. Nach 6stündiger Einwirkungszeit steigt der Mitoseindex geringfügig an, die Aberrationsausbeute dagegen liegt sogar - statistisch allerdings nicht signifikant - höher als in den behandelten Kontrollen. Es wäre denkbar, daß einige Zellen der ersten Kultur, deren hohe Anfangskonzentration nach 6 Stunden auf die Hälfte, also auf etwa $5,0 \times 10^{-7}$ Mol, verdünnt wurde, sich doch noch zu teilen vermochten und mit ausgewertet wurden. Dies sollte sich an einem Vergleich der interzellulären Verteilung der Aberrationen mit einem Versuch der Serie A (Trenimondosis: $5,0 \times 10^{-7}$ Mol) erkennen lassen (Tab. 27). Ein statistisch zu sichernder Unterschied ist nicht feststellbar ($P = 0,07$). Die größten χ^2 -Werte treten sogar bei niederen Schädigungsgraden auf. Dies spricht dafür, daß keine - stark geschädigten - Zellen der ersten Kultur miterfaßt wurden. Es ist sogar anzunehmen, daß ein Teil der Lymphocyten aus der ersten Kultur nach 6 Stunden bereits zerfallen ist und damit indirekt für den Anstieg des Mitoseindex verantwortlich ist. In den Versuchen mit längerer Einwirkungszeit Δt_2 macht sich dies noch stärker bemerkbar, was in den Präparaten daran zu erkennen ist, daß sich das Verhältnis von kleinen, pyknotischen Kernen zu transformierten Zellen immer mehr zu den letzteren verschiebt. Quantitative Aussagen lassen sich daher aus dem Verlauf des Mitoseindex nicht ziehen, wohl dagegen aus dem Schädigungsgrad der Chromosomen, da nach einem Δt_2 von 12 und 24 Stunden mit einiger Sicherheit nur noch Zellen aus der zweiten Kultur zur Teilung gelangen. Hierbei zeigte sich, daß die Wirksamkeit des Agens innerhalb von 24 Stunden auf ein Fünftel der ursprünglichen zurückgegangen war (Abb. 23).

Diese Versuchsergebnisse sagen zunächst nichts darüber aus, ob das unveränderte Trenimon für die cytologischen Effekte verantwortlich ist, irgendwelche Hydrolyseprodukte, die im Medium entstanden sind oder Abbaustufen, die beim Zerfall der stark geschädigten Zellen möglicherweise wieder freigesetzt wurden. Auch die auf S. 4 erwähnte reversible H_2O_2 -Bildung durch den Grundkörper könnte eine Rolle spielen, da bei der Vereinigung beider Kulturen Sauerstoff Zutritt hatte. In Drosophilaexperimenten (LÜERS u. RÖHRBORN 1965) sowie bei Mäuseversuchen (RÖHRBORN u. VOGEL 1967) erwies sich das Benzochinon allerdings als nicht mutagen.

Da sich das Aberrationsmuster nicht von dem der anderen vergleichbaren Versuche unterscheidet, wäre die einfachste Erklärung, daß in dem Medium der ersten Kultur auch noch nach 24 Stunden Trenimon vorhanden ist, welches auf die zweite Zellpopulation einwirken kann.

Die Ergebnisse zeigen somit, daß während der gesamten Behandlungszeit mit einer Schädigung der Zellen durch das Agens zu rechnen ist.

Repair

Bei der Beurteilung der Aberrationsausbeute und -verteilung ist zu beachten, daß neben der Induktion der Schäden durch das Mutagen in der Zelle noch Reparatur (Repair)-vorgänge ablaufen, die ebenfalls wieder dem Einfluß des Agens unterliegen können (WOLFF u. LUIPOLD 1956). Diese können zur Herstellung der ursprünglichen Struktur (Restitution) führen oder zur Vereinigung von Bruchflächen, die in verschiedenen Abschnitten eines Chromosoms gelegen oder auf mehrere Chromosomen verteilt sind (Reunion) und damit Ursache von intra- bzw. interchromosomalen Umbauten werden.

Einen Anhalt dafür, daß auch nach Einwirkung eines so starken Mutagens wie des Trenimon das "Repairsystem" noch weitgehend intakt zu sein scheint, bieten die Abb. 8 u. 9. Trotz der vielen Aberrationen ist es noch zu zahlreichen Verheilungen gekommen, wie aus der großen Anzahl der Translokationen hervorgeht. In Abb. 10 weist ein asymmetrisches Interchange darauf hin, daß auch bei noch größerer Schädigung Reunionen möglich sind. Erst bei so weitgehender Zerstückelung der Chromosomen wie in Abb. 11 lassen sich diese Vorgänge cytologisch nicht mehr nachweisen.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Restitution wurden verschiedene Schätzverfahren entwickelt (Übers.: RIEGER u. MICHAELIS 1967 S. 164 ff). Eines davon beruht auf dem Verhältnis der vollständigen zu den unvollständigen Translokationen. Untersuchungen an menschlichen Blutzellen ergaben nach Mitomycin C - Zugabe 68 % vollständiger Interchange (SHAW u. COHEN 1965) und 48 % nach Chinon I - Applikation (OBE 1967). Mit 59 % lag der Anteil der vollständigen nach Trenimonbehandlung sogar noch über dem der bifunktionellen Verbindung (s.S.26), wobei für symmetrische und asymmetrische Translokationen das Verhältnis der vollständigen (C)- zu den unvollständigen (I) - Typen nahezu gleich war (1,48 bzw. 1,43 : 1 ; $P = 0,89$). Absolute Zahlenangaben zum Umfang der Restitution sollen hier nicht getroffen werden. Nach Einwirkung von Röntgenstrahlen scheinen über 90% der primär gesetzten Brüche wieder zu verheilen (LEA 1955). OBE (1967) schätzt diesen Anteil auf 17 % nach Chinon I - Behandlung. Warum nach Applikation dieser Substanz mit zwei Äthyleniminogruppen weniger vollständige Austauschfiguren auftreten als nach Zugabe des wesentlich wirkungsvolleren Mutagens Trenimon wird in anderem Zusammenhang auf S.64 diskutiert.

Daß sich aus der interzellulären Verteilung der Brüche und Translokationen Rückschlüsse auf Restitutionsvorgänge ziehen lassen, konnte OBE (1967) überzeugend nachweisen. Er fand regelmäßig eine gleichsinnige Abweichung von der Zufallsverteilung, wobei Zellen mit keinen oder sehr vielen Aberrationen zu häufig, Metaphaseplatten mit einer oder wenigen Schädigungen dagegen zu selten vertreten waren. Ganz entsprechende Ergebnisse erhielten KIHLMAN u. ERIKSSON (1962) nach Einwirkung verschiedener Radiomimetika auf *Vicia faba*, sowie MANTEL u. GREENBLATT (1962), die Säugerzellen einer Röntgenbestrahlung aussetzten. Diese Autoren interpretieren ihre Ergebnisse damit, daß Zellen gemeinsam ausgewertet wurden, die sich zum Zeitpunkt der Behandlung in unterschiedlich sensiblen Zellstadien befanden. OBE hingegen geht davon aus, daß die primär gesetzten Schäden einer Poissonverteilung folgen, durch die Restitution jedoch das ganze Verteilungsmuster verschoben wird, wobei sich in der O-Klasse vollständig reparierte Zellen ansammeln. Der relativ hohe Anteil stark geschädigter Metaphasen wird auf eine Störung des Repairvorganges in diesen Zellen zurückgeführt. Diese Verhältnisse stellen sich ein, wenn

die durchschnittliche Zahl der Aberrationen pro Zelle nicht wesentlich über 1 hinausgeht. Bei höheren Mittelwerten sollte nicht nur die 0-Klasse sondern auch einige folgende überrepräsentiert sein.

Auch in den Trenimonexperimenten ergaben sich Unterschiede zur Poissonverteilung, die mit steigender Konzentration immer deutlicher wurden und zudem die charakteristischen Abweichungen von den theoretischen Werten aufwiesen (Tab. 12), so daß bei der stärksten Dosis ($5,0 \times 10^{-7}$ Mol) die Klassen mit 0 - 3 Brüchen pro Zelle zu häufig vertreten waren. Eine derartige Verteilung stellt sich auch nach Koffeinbehandlung ein (OSTERTAG 1966). Betrug der Durchschnittswert der Brüche 14 (0,68), lag die Anzahl der Zellen mit 0 - 9 (0) Aberrationen über der theoretischen Erwartung.

Interessant ist, daß die trenimoninduzierten Brüche auch bei unterschiedlicher Einwirkungszeit diesem interzellulären Verteilungsmuster folgen (Tab. 13), was gegen die Interpretation von KIHLMAN u. ERIKSSON (1962) spricht, aber für die Annahme, daß Reparaturprozesse in der S- und G_2 -Phase stattfinden können.

Aus Tab. 12 ist weiterhin zu entnehmen, daß das Verhalten der Isochromatidbrüche ebenfalls mit diesen Vorstellungen zu vereinigen ist, ebenso wie das der Translokationen. Da deren Anzahl in den meisten Versuchen jedoch nicht über zwei pro Zelle hinausging, wurde nur für die höchste Konzentration eine derartige Berechnung durchgeführt.

Betrachtet man die Verhältnisse, die sich für die Läsionen der Versuchsserien A und B ergeben, so zeigt sich - mit einer Ausnahme - stets eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung nach Poisson. In der Regel ist die Klasse mit einer Aberration sogar zu häufig vertreten. Es ist denkbar, daß dieses abweichende Verhalten durch die vielen spontan auftretenden Läsionen bedingt ist (vgl. Tab. 13). Die relativ niedrige durchschnittliche Schädigungsrate pro Zelle reicht möglicherweise nicht aus, diesen Effekt auszugleichen. Allein in der 2-Stunden-Kultur mit durchschnittlich 4,82 AL pro Zelle ergibt sich in gleicher Weise wie für die anderen Aberrationen eine - signifikante - Abweichung von der Poissonverteilung. Wird Chinon I ebenfalls in der G_2 -Phase zugegeben, zeigen auch hier die Läsionen das gleiche Verteilungsbild (OBE 1968). Dies würde bedeuten, daß in diesem Abschnitt des Gene-

rationszyklus die Läsionen noch repariert werden können, was auch mit den Annahmen von BELL und WOLFF (1964), sowie von TAYLOR et al. (1962) in Übereinstimmung steht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ⁱⁿ Zellen, die verhältnismäßig stark durch Trenimon geschädigt sind, noch Reparaturprozesse ablaufen können. Diese Repairvorgänge wurden auch zur Interpretation der interzellulären Verteilung der Aberrationen herangezogen. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung mit den Chinon I-Versuchen von OBE (1967).

Aberrationsmuster

Untersuchungen, die überwiegend an pflanzlichen Objekten durchgeführt wurden, ergaben, daß die verschiedenen chemischen Mutagene auf Grund ihres Aberrationsmusters, das sie in Abhängigkeit vom Generationszyklus der Zellen induzieren, in drei Klassen eingeteilt werden können (KIHLMAN 1966, RIEGER u. MICHAELIS 1967):

a) Agenzien mit verzögertem (delayed) Effekt.

Hierzu gehören die meisten radiomimetischen Verbindungen, also auch die alkylierenden Substanzen. Diese erzeugen in der G₂-Phase keine sofort sichtbaren Schäden, sondern nur, wenn sie in der S- oder G₁-Periode zugegen sind. Es treten ausschließlich Chromatidaberrationen auf, von denen ein beträchtlicher Anteil aus Reunionsfiguren besteht.

b u. c) Agenzien mit verzögertem und nicht-verzögertem Effekt.

Während das morphologische Bild der verzögerten Effekte weitgehend dem unter a) entspricht, können die, zumeist in der G₂-Phase gesetzten, "non-delayed effects" vom b) Austausch-Typ sein und zahlreiche Reunionen aufweisen, wie nach 8-Äthoxykoffein oder Streptonigrin-Behandlung oder c) hauptsächlich aus achromatischen Läsionen und Brüchen bestehen (Fragment-Typ), was u.a. nach Zugabe von DNS-Synthese-Inhibitoren gefunden wurde.

Aufgrund seiner chemischen Konstitution sollte das Trenimon in die Klasse a) gehören. Ganz offensichtlich treten aber sofort nach Behandlung, d.h. ohne Verzögerung, die ersten Schäden: Läsionen und Brüche aber auch offene Isochromatidbrüche auf, Aberrationen also vom Fragment-Typ.

Die ersten Reunionsfiguren lassen sich in der 8-Stunden-Kultur nachweisen. In 100 Metaphaseplatten wurden zwei Transloka-

tionen und ein Isochromatidbruch mit Schwesterstrangreunion gefunden. Diese Schäden sind charakteristisch für den verzögerten Effekt. Nimmt man an, daß sie - ebenso wie bei pflanzlichen Objekten - in der S-Phase erzeugt werden, so zeigt bereits das morphologische Bild der Aberrationen an, daß 4 - 8 Stunden nach der Substanzzugabe einige Zellen in der Metaphase arretiert wurden, die sich zum Zeitpunkt der Applikation des Mutagens noch in der Syntheseperiode befanden. Das steht in voller Übereinstimmung mit den autoradiographischen Befunden (Tab. 11), wonach bei 17 von 92 Metaphasen ein Einbau von ^3H -TdR nachgewiesen werden konnte. Mit zunehmender Einwirkungszeit der Substanz werden immer mehr Zellen, die noch in der Synthesephase geschädigt werden konnten, zur Auswertung gelangen. Parallel dazu steigen die Brüche, Isochromatidbrüche und Translokationen an (Abb. 18). Aus der Häufigkeitskurve (Abb. 19) ist zudem ersichtlich, daß insbesondere der Zuwachs der Reunionsfiguren darauf zurückzuführen ist, daß immer mehr derart geschädigte Zellen hinzukommen.

Mit verlängerter Einwirkungszeit nimmt die Anzahl der Läsionen dagegen deutlich ab, was auch von OBE (1967) nach Chinon-Zugabe gefunden wurde. Die einfachste Deutung dafür ist, daß dieser Aberrationstyp überwiegend in der G_2 -Phase induziert wird. Läsionen treten zwar auch noch in den 24- und 40-Stunden-Kulturen auf, da das Trenimon aber eine lange Einwirkungsdauer besitzt, können diese ebenfalls in der G_2 -Phase induziert worden sein. Hierfür spricht auch ihre intrazelluläre Verteilung, die mit der der 2-Stunden-Kultur praktisch übereinstimmt (Tab. 14 und 19). Während die Wirksamkeit des Trenimon jedoch annähernd linear mit der Zeit abnimmt (Abb. 23), geht die Zahl der Läsionen vom 24- zum 40-Stunden-Termin nur noch geringfügig zurück. Dies spräche dafür, daß auch in früheren Abschnitten des Generationszyklus Läsionen eingeleitet werden können.

Weitere Hinweise zur Entstehung der verschiedenen Aberrationstypen liefert die Korrelationsanalyse zum Schädigungsmuster der Zellen. Der Korrelationskoeffizient (r) sagt zwar nichts über einen ursächlichen Zusammenhang aus, er gibt aber an, ob der Wert des einen Merkmals durch das andere mehr oder weniger stark mitbestimmt wird. Hierbei kann z.B. eine einseitige oder wechselseitige Abhängigkeit vorliegen, aber auch eine gemeinsame Beeinflussung durch eine dritte Größe eine Rolle spielen. Der Anteil der

Variation, den diese Faktoren bestimmen, wird durch r^2 wiedergegeben, d.h. mit steigendem r nimmt der Zusammenhang unverhältnismäßig stark zu oder anders ausgedrückt: einem niedrigen Korrelationskoeffizienten ist eine relativ geringere Bedeutung beizumessen.

Die Läsionen sind nur mit den Brüchen eindeutig positiv korreliert. In der 40-Stunden-Kultur ist diese Beziehung allerdings nicht mehr gegeben (Abb. 39). Die schwach signifikante, positive Korrelation zwischen den Läsionen und Isochromatidbrüchen nach 24-stündiger Einwirkungszeit in zwei Versuchen (Abb. 38) sollte nach dem oben ~~gesagten~~ nicht zu hoch bewertet werden. Zwischen den Brüchen und den anderen Aberrationen bestehen deutliche Wechselwirkungen, die jedoch mit den Isochromatidbrüchen nicht mehr gegeben sind, wenn die Substanz erst zwei Stunden vor der Aufarbeitung appliziert wird.

In Übereinstimmung mit den zuvor getroffenen Feststellungen lassen sich diese Ergebnisse so interpretieren, daß die Brüche und Läsionen in der G_2 - und S-Phase z.T. unabhängig voneinander entstehen, die Läsionen während der DNS-Replikation jedoch überwiegend repariert werden oder zu Brüchen führen. Die fehlende Korrelation im 40-Stunden-Versuch könnte ein Hinweis dafür sein, daß in der G_1 -Periode andere Verhältnisse vorliegen.

Für die Auffassung, daß zur Entstehung von Translokationen zwei Brüche erforderlich sind, die auf Grund ihrer Lagebeziehung miteinander Reunion eingehen können, spricht die gesicherte Wechselwirkung zwischen den B' und den RB' und deren übereinstimmende interchromosomale Verteilung (Tab. 15).

Die positive Korrelation zwischen den B' und den B'' sowie der morphologische Befund, daß an der einem Bruch gegenüberliegenden Stelle der Schwesterchromatide eine Läsion auftreten kann (Abb. 39), unterstützen OBEs (1967) Annahme, daß zur Entstehung eines Isochromatidbruches zunächst ein einfacher Bruch vorliegen muß, der nach einer gewissen Zeit an etwa homologer Stelle in dem anderen Schenkel einen zweiten nach sich zieht. Die statistisch nicht zu sichernde Wechselwirkung im 2-Stunden-Termin könnte ein Hinweis dafür sein, daß dieser Vorgang etwas längere Zeit benötigt und ein Teil der Isochromatidbrüche zudem auf andere Weise entsteht.

Es ist denkbar, daß ein Trenimonmolekül ein cross-linking zwischen den beiden - bis zur Prophase umeinandergewundenen - Chromatiden bewirkt und dadurch die Voraussetzung für die Entstehung eines B" gegeben wäre. Vermutlich entstehen diese Aberrationen auch nach Strahleneinwirkung an solchen Überkreuzungsstellen. In beiden Fällen würden es sog. Ein-Treffer-Ereignisse sein. Übereinstimmend mit dieser Hypothese fanden IYER und SZYBALSKI (1963) bei Untersuchungen an Bakterien und menschlichen Zellen, daß die alkylierende Verbindung Mitomycin C zu einem cross-linking der komplementären DNS-Stränge führt. VIG et al. (1968) nahmen zudem an, daß dieser Effekt des Antibiotikums Daunomycin die Reunion zwischen den Chromosomen begünstigt.

Einem derartigen Reaktionsmechanismus sollte nach Trenimonbehandlung eine größere Bedeutung zukommen als nach Einwirkung einer bifunktionellen Verbindung. Er könnte den im Vergleich zu den B' etwas höheren Anteil der B" in diesen Experimenten gegenüber den Chinon I - Versuchen OBEs (1967) erklären. Da in diesem Falle die vier Bruchenden nahezu gleichzeitig und auch dicht beieinander entstehen, könnten auf diese Weise Schwesterstrangreunionen wie in Abb. 3 eintreten, die nach Chinon I - Zugabe nicht gefunden wurden.

Ein cross-linking zwischen den Chromatiden verschiedener Chromosomen würde dann entsprechend die Entstehung vollständiger Translokationen begünstigen. Auch diese traten nach Trenimonbehandlung häufiger als nach Chinon I auf.

Abgesehen von diesen recht geringen Unterschieden lassen sich bezüglich der Aberrationstypen und ihrer relativen Häufigkeiten zueinander keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Anzahl der reaktiven Gruppen feststellen. Auch die Befunde anderer Autoren, die menschliche Zellen mit alkylierenden Verbindungen behandelten, stimmen hiermit gut überein. Insgesamt läßt sich das gefundene Schädigungsmuster am einfachsten mit der klassischen Bruch-Reunions-Hypothese beschreiben, die auf SAX (1940) zurückgeht. Andere Vorstellungen werden bei RIEGER und MICHAELIS (1967) ausführlich diskutiert. Es scheint allerdings, daß das monofunktionelle Äthylenimin in der G₂-Phase keine Aberrationen auszulösen vermag (CHANG u. ELEQUIN 1967), dagegen erwartungsgemäß Brüche und Translokationen in der früheren Interphase (OSTERTAG 1966).

In qualitativer Hinsicht unterscheidet sich das Schädigungsbild, welches sich nach Einwirkung vergleichbarer Substanzen an pflanzlichen Objekten ergibt, praktisch nicht von dem an menschlichen Zellen, was ein Vergleich mit den Befunden von MICHAELIS, RIEGER und SIEBER (1964) deutlich macht. In den Zahlenrelationen der Aberrationen zueinander treten jedoch ganz erhebliche Abweichungen auf, worauf bereits HAMPEL und GERHARTZ (1965) sowie VRBA (1967a) hinwiesen. So fanden sich zum Beispiel nach TEM-Behandlung von Vicia-Wurzelspitzen deutlich mehr Isochromatidbrüche mit Schwesterstrangreunion als einfache B", auch die Tri- radiale waren so häufig, daß es sinnvoll schien, sie getrennt von den übrigen Translokationen auszuwerten (OCKEY 1957).

Hier konnte zudem gezeigt werden, daß sich diese beiden Testsysteme gegenüber alkylierenden Verbindungen auch in Bezug auf die sensiblen Phasen ungleich verhalten. Während bei Vicia nur sog. verzögerte Effekte auftreten, werden nach Trenimonbehandlung menschlicher Zellen Schäden auch in der G₂-Phase gesetzt (nicht-verzögerte Effekte vom Fragment-Typ). Eine Erklärung für diesen Unterschied kann bisher nicht gegeben werden.

Interchangeanalyse

Die Einteilung der Translokationen wurde von der Mehrzahl der Untersucher dem Beispiele von SAX (1940) folgend anhand zweier Charakteristika vorgenommen: der Symmetrie (s.S.20) und der Vollständigkeit. Es ist das Verdienst EVANS' (1961), darauf hingewiesen zu haben, daß die Entstehung der symmetrischen bzw. asymmetrischen Formen abhängig ist von der Lage der Chromosomen zueinander (Polarität) und der Art und Weise der Reunion, welche überkreuz (X) oder bogenförmig (U) erfolgen kann. In der Metaphase führt dies zu charakteristischen Kreuzfiguren (Abb. 5). Von diesen lassen sich die symmetrischen in polarisiert X-förmige (PX) und nicht-polarisiert U-förmige (NU) unterteilen, welche sich wiederum gegen die PU- bzw. NX-Typen der asymmetrischen Translokationen abgrenzen lassen. FOX (1966) hat diese an Vicia abgeleiteten Vorstellungen für Heuschreckenchromosomen übernommen und OBE (1967) diese auf menschliche Chromosomen übertragen.

In menschlichen Metaphaseplatten lassen sich die N- und P-Formen nicht direkt erkennen, sondern nur indirekt erschlies-

sen, da z.B. nach dem Schema der Abb. 5 symmetrisch, X-förmige Interchange nur polarisiert sein können, asymmetrisch X-förmige dagegen nicht-polarisiert sein müssen. Hier nun tritt ein zusätzliches Problem auf, welches bei den überwiegend akrozentrischen Chromosomen von *Vicia* und *Schistocerca* nicht gegeben ist. Eine X-förmige Reunion zwischen dem langen und dem kurzen Arm zweier, wie in Abb. 40b gleich ausgerichteter, submetazentrischer Chromosomen führt zu einem asymmetrischen Interchange, welches vom PX-Typ wäre, nach der bisherigen Auswertung aber in die Gruppe NX einzuordnen wäre. Wollte man diese Möglichkeit generell berücksichtigen, müßte man jede der Klassen um eine erweitern. Es gäbe dann also z.B. PX-Formen bei den symmetrischen und asymmetrischen Translokationen, die man jedoch nicht mehr von den NX-Typen unterscheiden könnte.

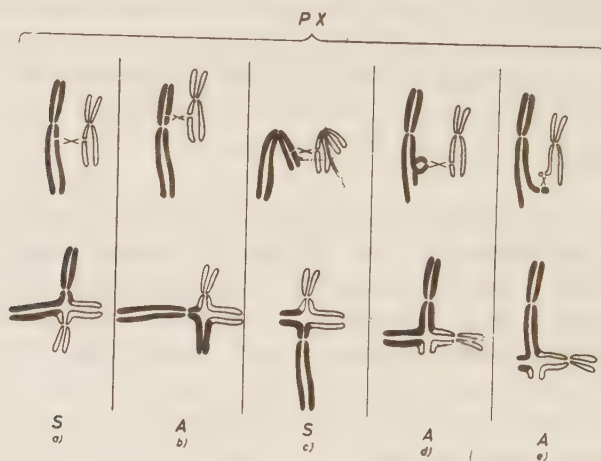


Abb. 40

Schematische Darstellung der Entstehungsweise polarisierter symmetrischer und asymmetrischer Translokationen nach X-förmiger Reunion.

Erklärung der Abkürzungen s.S. 94

Welche Bedeutung diesen theoretischen Überlegungen in der Praxis zukommt, ist jedoch ungewiß. Es ist nämlich fraglich, ob

Die Lage der Arme zueinander im Interphasekern derjenigen von Abb. 40b entspricht. Wahrscheinlicher ist, daß, wie bei der Anaphasebewegung zu den Polen hin, die Chromosomen in der Centromerregion abgelenkt sind und dabei gleichsam akrozentrische Elemente darstellen. Nach einer X-förmigen Reunion (Abb. 40c) zwischen einem kurzen und einem langen Arm, würde dies wie bei Abb. 40a zu einem symmetrischen PX-Interchange führen und damit auch nach dem Schema der Abb. 5 richtig klassifiziert werden.

Diese Schwierigkeiten lassen sich jedoch prinzipiell umgehen, wenn, wie in dieser Arbeit, nur diejenigen Austauschvorgänge berücksichtigt werden, die sich entweder zwischen zwei langen oder zwei kurzen Armen ereignet haben.

Unberücksichtigt gelassen wurden ferner die Möglichkeiten, daß auch ein Austausch zwischen einer "geraden" und einer schleifenbildenden Chromatide erfolgen kann (Abb. 40d) oder zwischen zwei umgebogenen Enden (Abb. 40e). Beides dürfte verhältnismäßig selten eintreten und könnte zudem an menschlichen Chromosomen vermutlich nicht erkannt werden.

Da weiterhin nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Art der Aufbiegung der Translokationen, auf der ja die Unterscheidung in X- und U-Typen beruht (s.S.21), davon mitbestimmt wird, ob es sich um vollständige oder unvollständige Formen handelt, wurden nur die C-Typen ausgewertet, bei denen die Bruchstellen zudem nicht zu weit distal oder proximal lagen (vgl. Abb. 6). Durch diese Einschränkungen wurde die Zahl der analysierten Aberrationen auf 42 verringert.

Es ergab sich dann, daß das Verhältnis P : N für symmetrische und asymmetrische Translokationen praktisch gleich war (19 : 8 bzw. 10 : 5) und die polarisierten insgesamt 69 % ausmachten. Andere Autoren fanden 88 % (EVANS 1961), 66 % (FOX 1966), 80 % (OBE 1967). Dieses übereinstimmend deutliche Überwiegen der gleich orientierten Chromosomen ist ein Hinweis dafür, daß deren Lage im Interphasekern noch durch die Ausrichtung in der vorausgegangenen Anaphase bestimmt wird und anschließend keine größeren Umlagerungen mehr stattzufinden scheinen. Bereits Beobachtungen von BOVERI aus dem Jahre 1907 und BELAR im Jahre 1928 (zit. b. EVANS 1961) hatten dafür Anhaltspunkte geliefert. Bei einem Vergleich der X- und U-Typen ergibt sich bei OBE (1967) keine statistisch zu sichernde Abweichung von einem 1 : 1 Verhältnis, was auch den

Ergebnissen bei LEA (1955) entspricht.

Nach Trenimonbehandlung treten etwas mehr (57,1 %) X- als U-förmige Translokationen auf. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Für ein reales Überwiegen der ersteren spricht aber doch, daß mehr S- als A-Formen zu finden sind (159 : 119). Für ein 1 : 1 Verhältnis beträgt die Wahrscheinlichkeit P nur 0,015. Da die polarisierten Translokationen wesentlich zahlreicher als die nicht-polarisierten sind, sollte das vermehrte Auftreten der symmetrischen Formen auf deren starke Besetzung der PX-Klasse zurückzuführen sein, da von den asymmetrischen sämtliche polarisierten Translokationen U-förmig sind (vgl. Abb. 5).

Die Angaben in der Literatur zu der Frage, welcher Reunionstyp bevorzugt auftritt, gehen auch bei Untersuchungen am gleichen Objekt weit auseinander (Übers. EVANS 1961, FOX 1966). Nach Einwirkung von Mitomycin C auf menschliche Zellen fanden SHAW u. COHEN (1965) ähnlich wie hier nach Trenimonzugabe mehr symmetrische Interchanges. Die dabei vorwiegend eingetretene X-förmige Reunion der Brüche ähnelt in der Lagebeziehung der verheilenden Enden den Bedingungen, wie sie bei einem crossing-over zwischen homologen Chromosomen in der Meiose gegeben sind. Dieser Verteilungstyp fand sich auch bevorzugt in den Experimenten von OLIVIERI und BREWEN (1966), die Austauschvorgänge an Diplochromosomen des Menschen und des chinesischen Hamsters untersuchten.

Aberrationsverteilung

Durch Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung chemisch induzierter Schäden hoffte man, spezifische Angriffsstellen der Agenzien zu entdecken. Hierfür bieten Objekte mit großen, einzeln zu identifizierenden Chromosomen manche Vorteile, wenn man dieser Frage mit cytologischen Methoden nachgehen will. Die 23 Paare des menschlichen Karyotyps lassen sich nur bedingt identifizieren (s.S. 12), sie wurden daher wie bei SHAW u. COHEN (1965), HAMPEL et al. (1966) sowie ENGEL et al. (1967) überwiegend gruppenweise erfaßt. Zudem lassen sich bei den metazentrischen Elementen die beiden Arme kaum voneinander unterscheiden.

Zur Beurteilung der interchromosomalen Verteilung der Aberrationen wurde die relative Metaphaselänge der Elemente zugrunde gelegt. Diese braucht mit der in der Interphase, in der die Schäden induziert wurden, jedoch nicht übereinzustimmen. So können hetero-

chromatische Segmente, die in "Ruhekernen" transformierter menschlicher Lymphocyten nachzuweisen sind (LIMA-DE-FARIA et al. 1963 u. 1965; HENEEN u. NICOLS 1966), sich in der Mitose jedoch isopyknotisch verhalten, die Längenbeziehungen beeinflussen. - NORRAN u. SASAKI (1966) fanden für die Häufigkeit, mit der dizentrische Chromosomen nach Bestrahlung menschlicher Blutzellkulturen auftraten, eine deutliche Korrelation zur Metaphaselänge. Da - mit gewissen Einschränkungen - angenommen werden kann, daß die durch dieses physikalische Agens gesetzten Schäden zufallsverteilt sind, liegt hiermit ein Hinweis vor, daß Unterschiede zwischen Inter- und Metaphaselänge der menschlichen Chromosomen nicht sonderlich ins Gewicht fallen dürften.

Nach Trenimonbehandlung ergab sich eine zufällige interchromosomale Verteilung der Brüche bzw. Beteiligung der Elemente an Translokationen, was sich auch nach Chinon I-Zugabe ergeben hatte (OBE 1967).

Das Verteilungsmuster der Läsionen nach 2- und 24-stündiger Einwirkungszeit der Substanz war praktisch gleich ($P = 0,96$; Tab. 14). In beiden Fällen zeigte sich, daß zu viele Läsionen auf die großen Chromosomen 1 und 2 und zu wenig auf die kleinen 19-Y und die kurzen Arme entfielen. In gleicher Weise fand OBE (1967) für das erste Paar mit einem P von 0,005 und die Gruppe 18-Y mit einem P von 0,018 die geringste Übereinstimmung mit den theoretischen Werten.

Dieses von den Brüchen und Translokationen abweichende Verhalten der Läsionen könnte einmal mit dem unterschiedlichen Zeitpunkt der Entstehung (s.S. 63) zusammenhängen. So fanden OSTERMAG u. GREIF (1967), daß nach Koffeinbehandlung in der G_1 -Phase eine signifikant andere Verteilung der Aberrationen als in der späten Syntheseperiode auftrat.

Zum anderen ließe sich dieser Befund auf eine differentielle Kontraktion der langen und kurzen Arme in den colcemidbehandelten Kulturen zurückführen. So vermuteten ROTHFELS u. SIMINOVITCH (1958) nämlich, daß die kleinen Chromosomen beim Rhesusaffen in der Mitose eine relativ stärkere Spiralisierung als die langen Chromosomenschenkel zeigen. Dadurch aber würde die Identifizierung ungefärbter Abschnitte in den kleinen Segmenten erschwert. Die Feststellung von Unterbrechungen in der Struktur, also von Brüchen, bzw. der Beteiligung von Chromosomen an Translokationen, wäre davon jedoch nicht betroffen.

Unabhängig davon, welche Bedeutung man diesen Unterschieden zumessen will, zeigt die interchromosomale Verteilung der Aberrationen insgesamt eine recht gute Übereinstimmung mit den Erwartungswerten, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergeben.

Weiterhin kann man untersuchen, in welcher Häufigkeit die Chromosomen miteinander an Translokationen beteiligt sind, woraus sich möglicherweise Rückschlüsse auf bestimmte Lageverhältnisse im Interphasekern ziehen lassen (OBE 1967).

Dieser Frage wurde von zahlreichen Autoren so nachgegangen, daß sie Messungen zur Anordnung der Chromosomen an den Metaphaseplatten vornahmen (BARTON et al. 1962, 1964 und 1965; MILLER et al. 1963 a u. b; FERGUSON-SMITH u. HANDMAKER 1963; MERRINGTON u. PENROSE 1964; KOWARZYK et al. 1965, 1966 u. 1967; BISHUN 1966; OCKEY 1966; COHEN u. SHAW 1967; STEWART 1967). Übereinstimmend ergab sich eine bevorzugte Lagebeziehung der akrozentrischen Chromosomen zueinander. Die anderen scheinen weitgehend zufällig verteilt, denn eine bevorzugte Lokalisation wurde nicht gefunden, bzw. anders lautende Ergebnisse widersprechen sich zum Teil.

Die Auswertung der an den 221 Translokationen beteiligten Chromosomen ergab, daß sie sich ihrer relativen Metaphaselänge entsprechend miteinander kombiniert hatten. Aus den Tabellen 17 u. 18 geht deutlich hervor, daß kein Grund für die Annahme einer natürlichen oder induzierten somatischen Paarung vorliegt, was SHAW u. COHEN (1965) nach Mitomycin C-Einwirkung feststellen konnten. Im Gegenteil, die Chromosomen der Gruppe 6-12,X sind in Übereinstimmung mit OBE's (1967) Ergebnissen sogar recht selten miteinander Reunionen eingegangen.

Bemerkenswert ist, daß die satellitentragenden Chromosomen, die gemeinsam an der Nucleolusbildung beteiligt sein sollen (OHNO et al. 1961), keine Tendenz zeigen, besonders häufig zusammen in Translokationen aufzutreten. EVANS u. BIGGER (1961) fanden sogar bei *Vicia faba*, daß derjenige Arm des metazentrischen Elementes, an dem der Nucleolus synthetisiert wird, seltener an Austausch teilnehmen als der andere.

Versucht man, in der frühen Prophase den Verlauf einzelner Chromosomen zu verfolgen, so scheint es, daß diese den Kern in zufälliger Anordnung durchziehen (vgl. SWANSON 1960, S. 44). Erst recht sollte dies in der Interphase zutreffen, in der die

Entspiralisierung noch wesentlich ausgeprägter ist. Da in diesem Stadium aber die Schäden induziert werden, deren Reunion zu den Interchangen führt, ist es verständlich, daß keine bevorzugte Kombination bestimmter Elemente miteinander gefunden wurde.

Eine längenproportionale interchromosomale Verteilung der Aberrationen schließt nicht aus, daß deren intrachromosomale Verteilung ungleich ist, was KIHLMAN (1960) für eine alkylierende Verbindung an Vicia bestätigen konnte. Während nach Strahlenbehandlung eine bevorzugte Lokalisation der Schäden in bestimmten Abschnitten nicht selten zu beobachten ist, ist dies die Regel nach Einwirkung chemischer Mutagene (Übers. EVANS 1962; COHEN u. SHAW 1965; KIHLMAN 1966; RIEGER u. MICHAELIS 1967). Bei einigen derartigen Agenzien kann sogar angenommen werden, daß bereits die Verteilung der primär gesetzten Schäden präferentiell ist.

Für die überwiegende Anzahl der Radiomimetika wurde gefunden, daß sie bevorzugt heterochromatische Zonen und die angrenzenden Euchromatinbereiche schädigen. Es ist wahrscheinlich, daß die durch besondere Vorbehandlung oder auch spontan auftretenden, sekundären Einschnürungen an menschlichen Chromosomen (Übers. MILES u. O'NEILL 1966), die zum Teil spät replizieren (SCHMID 1963), denjenigen heterochromatischen Abschnitten entsprechen, die in der Interphase als Chromozentren zu erkennen sind (LIMA-DE-FARIA et al. 1965). Diese Segmente der menschlichen Chromosomen erwiesen sich nach Einwirkung chemischer Mutagene häufig als besonders labil (GLASS 1964; SHAW u. COHEN 1965; ENGEL et al. 1967).

Der direkte Nachweis der Angriffsstelle eines Mutagens durch Zugabe markierter Verbindungen war bisher noch nicht sehr erfolgreich. Versuche hierzu mit Senfgas (LOVELESS 1953) oder Maleinsäurehydrazid (CALLAGHAN u. GRUN 1961) ergaben eine ähnliche Markierung des Eu- und Heterochromatins. Nach ^3H -Myleran-Einwirkung wurde nur ein ungleichmäßiger Einbau in den Kern beobachtet (MOUTSCHEN-DAHMEN et al. 1960).

Die intrachromosomale Aberrationsverteilung kann weiterhin vom Zeitpunkt der Behandlung abhängig sein. Das wurde nicht nur nach Bestrahlung (HSU 1963) sondern auch nach TMN-Zugabe gefunden (OCKEY 1959). Außerdem wurde mit steigender Konzentration

eine Abnahme des Lokalisationsgrades beobachtet (McLEISH 1952).

Auch nach Trenimonbehandlung ist die Verteilung der Schäden auf den Chromosomen offensichtlich nicht zufällig (Abb. 35). Nimmt man eine Unterteilung der Chromosomenarme in 5 gleich lange Abschnitte vor, so liegt das Maximum der Schäden regelmäßig in der gleichen, distalen Region. Dies gilt für die Läsionen nach 2- und 24-stündiger Einwirkungszeit sowie für die Brüche. Nur die Läsionen der Gruppe 16-Y und der kurzen Arme waren am häufigsten im mittleren Bereich (0,4-0,6) zu finden. Diese Verteilung stimmt mit den Ergebnissen von HAMPEL et al. (1966) überein, die u.a. auch das Trenimon untersuchten und eine Zunahme der Schädigungsintensität zum distalen Ende hin nachweisen konnten. Die intrachromosomale Verteilung der Aberrationen dieser trifunktionellen Verbindung unterscheidet sich kaum von der des Chinon I (OBE 1967). In beiden Fällen lassen sich die Verteilungsmuster weitgehend durch Poissonkurven beschreiben (Tab. 22 u. 23).

Zur Interpretation seiner Befunde nimmt OBE (1967) Restitutionsgradienten an, die unterschiedlich stark von der Centromer- und Telomerregion ausgehen und relativ für alle Schenkel gleich groß sind. Durch das Zusammenwirken beider kommt es dann zu einem Minimum an "Repair" in einer bestimmten Zone des distalen Bereiches und damit zu einem Maximum an feststellbaren Aberrationen.

Prinzipiell widersprechen die nach Trenimoneinwirkung erhaltenen Ergebnisse dieser Hypothese nicht. Die Übereinstimmung mit der Poissonverteilung ist allerdings nicht ganz so gut wie nach Chinon I-Zugabe. Die Verteilung auf den Chromosomen ist etwas gleichmäßiger, was Ausdruck eines Konzentrationseffektes (s.o.) sein könnte, da die durchschnittliche Zahl der Aberrationen pro Zelle in diesen Versuchen deutlich über der mit der bifunktionellen Verbindung lag.

Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß durch die, möglicherweise Repair-bedingte, Aberrationsverteilung das Vorhandensein instabiler Abschnitte überlagert wird, da die bisherigen Berechnungen sich nur auf Gruppen von Chromosomen bezogen. Allein für das Chromosom Nr. 2, das stets eindeutig zu identifizieren ist, ist es möglich, eine Einzelanalyse durchzuführen

(Abb. 37). Hierbei deutet sich eine zweigipflige Verteilung der Brüche und Läsionen an, wobei das distale Maximum auf die Wirkung der Restitutionsgradienten zurückzuführen wäre, das proximale an einer Stelle zu liegen scheint, die nach SCHMID (1963) verhältnismäßig spät repliziert, d.h. aus Heterochromatin bestehen sollte.

Insgesamt gesehen ergibt sich aber aus der gleichmäßigen interchromosomalen und der charakteristischen intrachromosomalen Verteilung der Aberrationen, daß in diesem System unter den vorliegenden Bedingungen dem Heterochromatin bei der Manifestation der Schäden keine wesentliche Bedeutung zukommen dürfte.

Aberrationsausbeute

Bei der Beurteilung der Dosis-Effekt-Beziehung eines chemischen Mutagens ist es, im Gegensatz zu Strahlenexperimenten, kaum möglich, von der zugegebenen Substanzmenge auf deren effektive Konzentration zu schließen. Insbesondere die alkylierenden Verbindungen können mit den verschiedensten Zellbestandteilen reagieren, bevor sie - evtl. schon verändert - in den Zellkern gelangen (s.S. 4).

Zum anderen wird in Abhängigkeit von der Konzentration die Dauer der verschiedenen Phasen des Generationszyklus beeinflusst, wodurch sich der Zeitpunkt der maximalen Aberrationsausbeute verschieben kann.

Zu berücksichtigen ist ferner, daß die Einwirkung des Trenimon nicht zeitlich begrenzt ist, sondern bis zum Abbruch der Kultur anhält. Versuche mit TEM an Vicia ergaben (RIEGER u. MICHAELIS 1965), daß die Ausbeute an Aberrationen erhöht wird, wenn zunächst eine wirkungsvolle Dosis des Agens appliziert wird und innerhalb von 4 Stunden eine zweite, die jedoch für sich allein nicht nachweisbar mutagen ist. Die Autoren nehmen an, daß neben echten Brüchen zunächst noch instabile Zustände induziert werden, die vier Stunden lang durch Nachbehandlung in echte Brüche überführt werden können. Mit einer ähnlich additiven Wirkung wäre auch im vorliegenden Falle zu rechnen.

Hält man den Zeitpunkt der Zugabe konstant und untersucht die Anzahl der Schäden pro Zelle in Abhängigkeit von der applizierten Dosis, so zeigt sich, daß der zunächst lineare Anstieg

des Kurvenverlaufes der B', AL und B" zur stärksten Konzentration hin deutlich abflacht (Abb. 14). Derartige Dosis-Effekt-Kurven wurden von OCKEY (1957) sowie MICHAELIS und RIEGER (1960) nach TEM-bzw. Myleran-Behandlung von Vicia-Wurzelspitzen gefunden. Sie lassen sich so interpretieren, daß bei der höchsten Dosis ein Teil der besonders stark geschädigten Zellen bereits in der Interphase zugrunde geht und damit nicht mehr zur Auswertung gelangt. Es wäre jedoch auch denkbar, daß infolge der zunehmenden Verzögerung des Generationszyklus, sich der Zeitpunkt der maximalen Aberrationsausbeute verschiebt. Eine sichere Entscheidung zugunsten einer der beiden Alternativen zu treffen, ist auf Grund der vorliegenden Angaben nicht möglich.

Interessant ist ein Vergleich mit den Ergebnissen von HAMPEL et al. (1966), die das Trenimon ebenfalls für 24 Stunden auf menschliche Blutzellen einwirken ließen. Die für 5 Brüche pro Zelle erforderliche Dosis berechneten sie zu rd. $3,0 \times 10^{-7}$ Mol.

In dieser Arbeit ergaben sich für $2,5 \times 10^{-7}$ Mol im Durchschnitt 4,9 Brüche pro Platte, für $5,0 \times 10^{-7}$ Mol 7,7. Hierbei wurden Translokationen doppelt, Brüche und Isochromatidbrüche einfach gezählt. Berücksichtigt man, daß die Aberrationsausbeute vom Blutspender abhängig sein kann (BENDER u. GOUGH 1963; OBE (1967) und die Unterscheidung zwischen Läsionen und Brüchen nicht ganz leicht ist, so kann man praktisch von einer völligen Übereinstimmung der Ergebnisse sprechen.

Untersucht man den Prozentsatz geschädigter Zellen in Abhängigkeit von der Dosis (Abb. 15), so ergeben sich für die B', AL und B" Sättigungskurven. Durch Transformation lassen sich diese in Gerade überführen (Abb. 16), wenn die Dosis logarithmisch aufgetragen und die Ordinate in Probits unterteilt wird. Dies ist mit der Annahme zu vereinen, daß eine normale Verteilung der Logarithmen der Dosen vorliegt, ein Befund, der sehr häufig bei der Wertbemessung eines Pharmakons erhalten wird. Der Anstieg der Geraden für die Isochromatidbrüche ist wesentlich flacher als der für die Brüche, was zu erwarten ist, wenn ein B' die Voraussetzung für das Auftreten eines B" bildet (s.S.63).

Bereits aus den Abbildungen 14 u. 15 war ersichtlich, daß die Translokationen eine andere Dosis-Effekt-Beziehung als die AL, B' und B" aufweisen. Ihr Kurvenverlauf läßt sich daher auch

nicht in gleicher Weise wie für die bisher besprochenen Aberrationen mit einer Probitgeraden darstellen. Das heißt, daß auch nach Trenimonbehandlung ein Unterschied in der Aberrationskinetik zwischen den - im Sinne der klassischen Strahlengenetik - sog. Ein-Treffer-Ereignissen (B' , AL , B'') und den Zwei-Treffer-Ereignissen (RB') feststellbar ist.

Quantitative Vergleiche der Aberrationsraten mit den Ergebnissen anderer Autoren, die die gleiche Substanz an unterschiedlichen Objekten bzw. an einem Objekt verschiedene Agenzien prüften, sind mit zahlreichen Unsicherheitsfaktoren belastet (Übers.: RIEGER u. MICHAELIS 1967). Eine nur orientierende Übersicht über diejenigen Chemikalien, die an menschlichem Gewebe in vitro getestet wurden (KIHLMAN et al. 1963; HAMPEL et al. 1966; OSTER-TAG 1966; CHANG u. ELEQUIN 1967; ENGEL et al. 1967 mit Literaturübersicht; OBE 1967; VOGEL u. Vrba 1967; Vrba 1967 a u. b), zeigt aber dennoch, daß das Trenimon zu den stärksten bisher untersuchten Mutagenen gehört, vielleicht sogar das wirkungsvollste darstellt.

Besonders interessant ist der Vergleich mit dem Chinon I, welches nur eine Äthyleniminogruppe weniger an dem Benzochinongrundkörper besitzt. Die Versuche von OBE (1967) mit dieser Substanz wurden unter analogen Bedingungen durchgeführt und einmal mit einer Konzentration (1×10^{-7} Mol), die auch für das Trenimon getestet wurde. Die Gesamtzahl der induzierten Brüche, berechnet aus $B' + B'' + 2 \times RB'$ abzüglich der jeweiligen Kontrollwerte, betrug für Trenimon 2,60. Für Chinon I ergab sich für die Versuchsperson H.J.H. ein Wert von 0,63, für die Versuchsperson E.S. ein Wert von 0,22. Eindeutig geht hieraus hervor, daß durch die gleiche Anzahl von Trenimonmolekülen etwa 4 - 12mal so viel Brüche verursacht werden wie nach Chinon I-Zugabe.

Noch ausgeprägter ist der Unterschied, wenn die Mutagenität an dem Prozentsatz rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen geprüft wird, der sich nach der Behandlung von meiotischen und postmeiotischen Spermatogenesestadien von *Drosophila* ergab (LÜERS u. RÖHRBORN 1965). Hierbei erwies sich die trifunktionelle Verbindung rund 100mal so wirkungsvoll wie die bifunktionelle, welche immer noch stärker mutagen als die beiden geprüften monofunktionellen Naphtochinone war.

Die chromosomenschädigende Wirkung von Benzochinonen mit nur einer funktionellen Gruppe wurde an menschlichen Zellen bisher nicht untersucht, so daß nur ein Vergleich mit dem unsubstituierten Äthylenimin herangezogen werden kann (OSTERTAG 1966b; CHANG u. ELEQUIN 1967). Da sich die Durchführung dieser Experimente in mehrfacher Hinsicht von den vorliegenden unterscheidet, kann nur annähernd geschätzt werden, daß die chromosomenschädigende Wirkung dieser Verbindung um mindestens 2 Zehnerpotenzen geringer zu sein scheint als die des Trenimon und damit auch noch deutlich unter der des Chinon I liegt.

Auch in der cytostatischen Wirkung unterscheiden sich diese beiden Chinonderivate erheblich. Läßt man die Agenzien in bestimmten Verdünnungen auf Tumorzellen einwirken und ermittelt, bei welcher Konzentration die Transplantabilität verlorenggeht, so zeigt schon diese nur orientierende Prüfung, daß die Hemmung durch das Trenimon beim Yoshida-Karzinom 100mal, beim Walker-Karzinom 10mal so stark war wie durch Chinon I (DOMAGK et al. 1959).

Ganz eindeutig hat sich somit eine Zunahme der mutagenen sowie cytostatischen Wirkung unabhängig vom Testsystem, aber bedingt durch die Anzahl der reaktiven Äthyleniminogruppen gezeigt. Eine Erklärung dafür zu finden, ist jedoch nicht mit cytologischen, sondern nur mit biochemischen Methoden möglich. Auf Grund der genetischen und cytogenetischen Untersuchungen erscheint es aber fraglich, ob die cross-linking-Hypothese (s.S. 5) ausreicht, die erhaltenen Befunde zu deuten.

Für die klinische Anwendung des Trenimon ist die offensichtlich positive Korrelation zwischen der Mutagenität und der teilungshemmenden Wirkung von Bedeutung (LUERS u. RÜHRBORN 1961). Aus dem Abfall des Mitoseindex und dem parallel dazu verlaufenden Anstieg der Aberrationshäufigkeit ist zudem ersichtlich, daß in vitro bereits niedrige Dosen, deren cytostatischer Effekt unerheblich ist, nachweisbar das Erbgut schädigen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß die Sicherheitsgrenze bei der Anwendung des Trenimon nur sehr gering ist, da diejenige Dosis, die 50 % der an Ratten gesetzten Yoshida-Karzinome heilt bereits bei etwas weniger als einem Viertel der Tiere zum Tode führt (DRUCKREY 1961). Den Erfolgen, die nach Trenimonbehandlung von Karzinomen der lymphatischen und retikulären Reihe erzielt wurden (KLEI-

BEL 1963), steht somit die mögliche somatische und beim Fortpflanzungsfähigen Menschen auch genetische Belastung gegenüber.

V. Zusammenfassung =====

- 1) Die alkylierende Verbindung 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon (1,4) (Trenimon, Bayer) wird zur Behandlung von Hämoblastosen und malignen Tumoren verwandt. Ihre teilungshemmende und chromosomenschädigende Wirkung wurde an menschlichen Lymphocyten untersucht. Sämtliche Experimente wurden mit dem Blut desselben Spenders nach der etwas abgewandelten Mikromethode von ARAKAKI und SPARKES (1963) durchgeführt.
- 2) Eine Trenimondosis von 1×10^{-6} Mol, 24 Stunden vor der Aufarbeitung zugegeben, unterbindet die Zellteilung praktisch vollständig. Die cytostatische Wirkung ist deutlich konzentrationsabhängig.
- 3) Es wurde stets die der Behandlung folgende Mitose erfaßt. Sämtliche Aberrationen sind vom Chromatid-Typ. Neben Brüchen, achromatischen Läsionen und Isochromatidaberrationen, Translokationen und Triradialen treten vereinzelt auch intrachromosomale Umbauten wie Duplikations-Deletionen oder Isochromatidbrüche mit Schwesterstrangreunion auf.
- 4) Bei 24stündiger Einwirkungszeit des Trenimon nehmen die Brüche, achromatischen Läsionen und Isochromatidbrüche im unteren Konzentrationsbereich von $0,25 - 2,5 \times 10^{-7}$ Mol annähernd linear zu; der Anstieg bis $5,0 \times 10^{-7}$ Mol ist etwas geringer. Die Häufigkeitskurven derart geschädigter Zellen zeigen deutlich Sättigungscharakter und lassen sich bei logarithmischer Dosis-skala zu Probitgeraden transformieren.
- 5) Die Translokationen unterscheiden sich in der Dosis-Effekt-Beziehung von den übrigen Aberrationen, da ihre Zunahme mit steigender Konzentration unverhältnismäßig stärker erfolgt und auch die Häufigkeitskurve keinen Sättigungscharakter aufweist.
- 6) Das Aberrationsmuster wurde in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substanzzugabe untersucht. Nach 2stündiger Behandlungsdauer treten überwiegend achromatische Läsionen auf. Mit zunehmender Einwirkungszeit geht deren Anzahl bis auf ein Drittel im

40-Stunden-Termin zurück. Die Brüche und Isochromatidbrüche dagegen steigen ständig an. Translokationen und Isochromatidbrüche mit Schwesterstrangreunion sind erst nach 8 Stunden nachweisbar.

- 7) Trenimon, 2 Stunden vor der Aufarbeitung zugegeben, beeinträchtigt nicht den Eintritt der Zellen in die Teilung, d.h. der Ablauf der späten G_2 -Phase wird nicht verzögert.
- 8) Autoradiographische Untersuchungen, der Verlauf des Mitoseindex sowie die Veränderung des Aberrationsmusters mit zunehmender Einwirkungszeit der Substanz machen es wahrscheinlich, daß die Dauer der frühen G_2 -Phase und der Ablauf der S-Periode verlängert werden.
- 9) Innerhalb von 6 Stunden ist die cytostatische und mutagene Wirkung des Trenimon in den Kulturen nicht nachweisbar zurückgegangen. Nach 24 Stunden ist noch rund ein Fünftel der ursprünglichen Wirksamkeit vorhanden.
- 10) Die interzelluläre Verteilung der Aberrationen wurde in Abhängigkeit von der Konzentration und der Einwirkungszeit des Trenimon untersucht. Die gleichsinnigen Abweichungen von einer zufallsgemäßen Verteilung werden auf die Wirkung von Restitutionsvorgängen zurückgeführt.
- 11) Die interchromosomale Verteilung der achromatischen Läsionen nach 2- und 24-stündiger Einwirkungszeit des Trenimon sowie der Brüche nach 24-stündiger Einwirkungszeit stimmen im wesentlichen mit der Erwartung überein, die sich auf Grund der relativen Metaphaselänge der Chromosomen ergibt. Abweichungen hiervon für die Läsionen werden auf eine differentielle Kontraktion der langen und kurzen Chromosomen zurückgeführt.
- 12) Die Chromosomen sind ihrer relativen Metaphaselänge entsprechend an Translokationen beteiligt und kombinieren zufallsgemäß miteinander. Daraus wird geschlossen, daß sie in der Interphase so weit entspiralisiert sind, daß sie den Kern annähernd regellos durchziehen.
- 13) Die Translokationen wurden gemäß der Einteilung von EVANS (1961) klassifiziert. Hierbei wurde auf die Schwierigkeiten in der Beurteilung der Polarität hingewiesen, die bei einer Reunion zwischen zwei submetazentrischen, menschlichen Chro-

mosomen auftreten können. Das Überwiegen der polarisierten Formen wird mit der Ausrichtung der Chromosomen in der vorausgegangenen Anaphase in Zusammenhang gebracht.

- 14) Der X-förmige Verheilungstyp scheint etwas häufiger zu sein als der U-förmige, wofür auch das Überwiegen der symmetrischen Translokationen gegenüber den asymmetrischen spricht. In der Lage der ausgetauschten Abschnitte zueinander ähnelt dieser Verheilungstyp dem crossing-over in der Meiose.
- 15) Die intrachromosomalen Verteilungen der achromatischen Läsionen nach 2- und 24-stündiger Einwirkungszeit des Trenimon sowie der Brüche nach 24-stündiger Einwirkungszeit stimmen im wesentlichen überein. In der Regel tritt ein Aberrationsmaximum im distalen Bereich der Chromatiden auf. Dem Heterochromatin scheint bei der Manifestation der Schäden keine besondere Bedeutung zuzukommen. Das Verteilungsmuster läßt sich auf die Wirkung vom Restitutionsgradienten i. S. OBES(1967) zurückführen.
- 16) Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse wird gezeigt, daß in Zellen mit vielen Brüchen auch sämtliche anderen Aberrationen besonders häufig auftreten. Dagegen konnte keine Wechselwirkung im Schädigungsgrad der Zellen zwischen achromatischen Läsionen und Isochromatidbrüchen, sowie Läsionen und Translokationen festgestellt werden. Mit zunehmender Einwirkungszeit verstärkt sich die positive Korrelation zwischen den Brüchen und Isochromatidbrüchen. Im 40-Stunden-Termin läßt sich dagegen eine Wechselwirkung zwischen Brüchen und Läsionen statistisch nicht mehr sichern. Auf die mögliche Bedeutung dieser Beziehungen zum Verständnis der Aberrationsentstehung wird hingewiesen.
- 17) In der Diskussion wird vor allem versucht, das Schädigungsmuster und die Aberrationsausbeute in Abhängigkeit vom Generationszyklus der Zellen zu interpretieren sowie die Aberrationsverteilung mit der Wirkung von Repairvorgängen zu erklären.

VI. Literatur

=====

- ALEXANDER, P., S.F. CONSENS, and K.A. STACEY, 1958: The reactions of the mutagenic alkylating agents with proteins and nucleic acids. In Ciba Found. Symp. on drug resistance in micro-organism. Churchill LTD., London, pp 294-318.
- ARAKAKI, D.T., and R.S. SPARKES, 1963: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2, 57-60.
- ATKINS, L., J.A. BÜÖK, and B. SANTESSON, 1966: Chromosome DNA-synthesis in the cells of a human triploid/diploid mosaik. *Hereditas* 55, 55-67.
- AURBACH, C., and J.M. ROBSON, 1944: Mutation chemically induced. Production of mutations by allylisothiocyanate. *Nature* 154, 81.
- BACQ, Z.M., and P. ALEXANDER, 1961: Fundamentals of radiobiology. Pergamon Press, London.
- BARTON, D.E., F.N. DAVID, and M. MERRINGTON, 1962: Numerical analysis of chromosome patterns. *Ann. hum. Genet.* 26, 349-353.
- BARTON, D.E., F.N. DAVID, and M. MERRINGTON, 1964: The positions of the sex chromosomes in the human cell in mitosis. *Ann. hum. Genet.* 28, 123-128.
- BARTON, D.E., F.N. DAVID, and M. MERRINGTON, 1965: The relative positions of the chromosomes in the human cell in mitosis. *Ann. hum. Genet.* 29, 139-146.
- BELL, S., and S. WOLFF, 1964: Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 51, 195-202.
- BERG, H. und H.E. JACOB, 1962: Biologische Wirkungen photochemischer Wasserstoffperoxydbildung. *Z. Naturforsch.* 17b, 306-309.
- BERG, H. und G. HORN, 1963: Zum Wirkungsmechanismus cytostatischer Äthylenimino-Benzochinonderivate. *Naturwissenschaften* 50, 356-357.
- BENDER, M.A., and D.M. PRESCOTT, 1962: DNA-synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes. *Exp. Cell Res.* 27, 221-229.

- BIANCHI, N.O., and M.S.A. DE BIANCHI, 1965: DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures. *Chromosoma* 17, 273-290.
- BISHUN, N.P., 1966: Association of human satellited chromosomes. *Experientia* 22, 223-224.
- BOOTSMA, D., and R.M. HUMPHREY, 1968: The progression of mammalian cells through the division cycle following ultraviolet irradiation. *Mut. Res.* 5, 289-298.
- BROOKES, P., and P.D. LAWLEY, 1961: The action of mono- and bi-functional alkylating agents on nucleic acids. *Biochem. J.* 80, 496-503.
- CALLAGHAN, J.J., and P. GRUN, 1961: Incorporation of C¹⁴-labeled maleic hydrazide into the roottip cells of *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Tradescantia paludosa*. *J. biophys. biochem. Cytol.* 10, 567-574.
- CARON, G.A., H.S. WILLIAMS, I. SARKANY, A.P. TODD, and H.M.C. GELL, 1965: Radioactive method for the measurement of lymphocyte transformation in vitro. *Lancet* 1965 II, 1266-1268.
- CARSTAIRS, K., 1961: Transformation of the small lymphocyte in culture. *Lancet* 1961 II, 984.
- CAVE, M.D., 1966: Revers patterns of thymidine-³H incorporation in human chromosomes. *Hereditas* 54, 338-355.
- CAVE, M.D., 1967: Chromosomal ³H-lysine incorporation and patterns of DNA synthesis in human cells. *Exp. Cell Res.* 45, 631-637.
- CAVE, M.D., and J.M. LEVITZKY, 1966: Tritiated thymidine uptake by group G chromosomes of female individuals with Downs syndrom. *Exp. Cell Res.* 43, 210-213.
- CHANG, T.H., and F.T. ELEQUIN, 1967: Induction of chromosome aberrations in cultured human cells by ethylenimine and its relation to the cell cycle. *Mut. Res.* 4, 83-89.
- CHICAGO CONFERENCE, 1966: In BERGSMAN, D. (ed.), Birth defects II, No. 2. The National Foundation - March of Dimes, New York, pp 1-21.
- COHEN, M.M., and M.W. SHAW, 1967: The association of acrocentric chromosomes in 1000 normal human male metaphase cells. *Ann. hum. Genet.* 31, 129-140.
- COMINGS, D.E., 1967: Sex chromatin, nuclear size and the cell cycle. *Cytogenetics* 6, 120-144.

- COOPER, H.L., and A.D. RUBIN, 1966: Synthesis of nonribosomal RNA by lymphocytes: a response to phytohemagglutinin treatment. *Science* 152, 516-518.
- D'AMATO, F. and O. HOFFMANN-OSTENHOF, 1956: Metabolism and spontaneous mutations in plants. *Advanc. Genet.* 8, 1-28.
- DEFENDI, V., and L.A. MANSON, 1963: Analysis of the life-cycle in mammalian cells. *Nature* 198, 359-361.
- DIAZ, M., and C. PAVAN, 1965: Changes in chromosomes induced by microorganism infection. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 54, 1321-1326.
- DOMAGK, G., L. JÜHLING und J. PÜTTER, 1959: Probleme der Chemotherapie der Tumoren. In *Med. Grundlagenforschung II*. Thieme Verlag, Stuttgart, pp 551-588.
- DRUCKREY, H., 1961: Chemotherapie des Krebses. *Grundlagen und Möglichkeiten. Med. Klin.* 56, 421.
- ENGEL, W., W. KRONE und U. WOLF, 1967: Die Wirkung von Thioguanin, Hydroxylamin und 5-Bromdesoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro. *Mut. Res.* 4, 353-368.
- EVANS, H.J., 1961: Chromatid aberrations induced by gamma irradiation. I The structure and frequency of chromatid interchanges in diploid and tetraploid cells of *Vicia faba*. *Genetics* 46, 257-275.
- EVANS, H.J., 1962: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Int. Rev. Cytol.* 13, 221-321.
- EVANS, H.J., and R.L. BIGGER, 1961: Chromatid aberrations induced by gamma irradiation. II Non randomness in the distribution of chromatid aberrations in relation to chromosome length in *Vicia faba* root-tip cells. *Genetics* 46, 277-289.
- EVANS, H.J., and D. SCOTT, 1964: Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic-hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49, 17-38.
- FEINE, U., 1959: Radiomimetische Stoffe. In SCHINZ, H.R., H. HOLTHUSEN, H. LANGENDORFF, B. RAJEWSKY und G. SCHUBERT, *Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung. Ergebnisse 1952-1958*, pp 943-974. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- FERGUSON-SMITH, M.A., and S.D. HANDMAKER, 1963: The association of satellited chromosomes with specific chromosomal regions in cultured human somatic cells. *Ann. hum. Genet.* 27, 143-156.
- FRIEDNER, T.M. et al., 1965: DNS- und RNS-Synthese in mit Phytohämagglutinin stimulierten Lymphocyten. *Schweiz. med. Wschr.* 95, 1499-1505.
- FOGH, J., and H. FOGH, 1965. Chromosome changes in PPLO-infected FL human amnion cells. *Proc. Soc. exp. Biol.* 119, 233-238.
- FOX, D.P., 1966: The effects of X-rays on the chromosomes of locust embryos. II Chromatid interchanges and the organisation of the interphase nucleus. *Chromosoma* 20, 173-194.
- FRESE, E., 1963: Molecular mechanism of mutations. In TAYLOR, J.H. (ed.), *Molecular genetics I*. Academic Press, New York and London, pp 207-270.
- FRITZ-NIGGLI, H., 1959: *Strahlenbiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GALPERIN, H., and Y. ROS, 1966: Choix d'une méthode de mesure des chromosomes humains. *Humangenetik* 2, 381-386.
- GERMAN, J., 1964: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. *J. Cell Biol.* 20, 37-55.
- GERMAN, J., 1966: A bibliography on autoradiographic studies of mammalian chromosomes. *Ann. Génét.* 9, 137-140.
- GLASS, B., 1964: The study of gene and chromosome mutations in human and other mammalian cell cultures. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 29, 177-183.
- GRIPBERG, U., 1965: Chromosome studies in some virus infections. *Hereditas* 54, 1-18.
- HÄBERLEHL, K.O. und W. DIEFENTHAL, 1966: Der Einfluß von Virusinfektion auf den Ablauf der Zellteilung. *Zbl. Bakt.* 199, 273-314.
- HÄFEL, K.E. und H. GERHARTZ, 1965: Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro durch Triäthylenmelamin. *Exp. Cell Res.* 37, 251-258.
- HÄFEL, K.E., B. KORBER, D. RÖSCH, H. GERHARTZ, and K.H. BINIG, 1966: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Blood* 27, 816-823.

- HANAWALT, P.C., and R.H. HAYNES, 1967: The repair of DNA.
Sci. Am. 216, 36-43.
- HAYHOE, F.G.J., and D. QUAGLINO, 1965: Autoradiographic investigations of RNA and DNA metabolism of human leukocytes cultured with PHA. Nature 205, 151-154.
- HEDDLE, J.A., H.J. EVANS, and D. SCOTT, 1967: Sampling time and the complexity of the human leukocyte culture system. In EVANS, H.J., W.M. COURT BROWN, and A.S. MCLEAN (ed.), Human radiation cytogenetics. North-Holland Publ. Company, Amsterdam, pp 6-19.
- HENEEN, W.K., and W.W. NICHOLS, 1966: Persistence of nuclei in short term and long term cell cultures and in direct bone marrow preparations in mammalian materials.
J. Cell Biol. 31, 543-561.
- HIRSCHHORN, K., F. BACH, R.L. KOLODNY, J.L. FIRSCHEIN, and N. HASHEM, 1963: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Science 142, 1185-1187.
- HSU, T.C., 1963: Longitudinal differentiation of chromosomes and the possibility of interstitial telomeres.
Exp. Cell Res. Suppl. 2, 73-85.
- IYER, V.N., and W. SZYBALSKY, 1963: A molecular mechanism of mitomycin C action: linking of complementary DNA strands. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50, 355-362.
- JOHNSON, J.M., and F. BERGEL, 1963: Biological alkylating agents. In Hochster, R.M., and J.H. Quaster (ed.), Metabolic inhibitors II. Acad. Press, New York, pp 161-192.
- KIHLMAN, B.A., 1960: The radiomimetic effect of N-nitroso-N-methylurethan in Vicia faba. Exp. Cell Res. 20, 657-659.
- KIHLMAN, B.A., 1961: Biochemical aspects of chromosome breakage. Advanc. Genet. 10, 1-59.
- KIHLMAN, B.A., 1964: Deoxyribonucleotide synthesis and chromosome breakage. In DARLINGTON, C.D., and K.R. LEWIS (ed.), Chromosomes today I. Oliver and Boyd, London, pp 108-117.
- KIHLMAN, B.A., 1966: Actions of chemicals on dividing cells. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

- ALLIUM, B.A., and T. ERIKSSON, 1962: The distribution between cell nuclei of isochromosome breaks and chromatid interchanges induced by radiomimetic chemicals in *Vicia faba*. *Hereditas* 48, 520-529.
- KILMAN, B.A., W.W. NICHOLS, and A. LEVAN, 1963: The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Hereditas* 50, 139-163.
- NIKUC, I. Y., and A.A. SANDBERG, 1964: Chronology and pattern of human chromosome replication I. Blood leukocytes of normal subjects. *J. nat. Cancer Inst.* 32, 1109-1143.
- KLEIBEL, F., 1963: Zur antineoplastischen Wirkung von Triäthylenimino-benzochinon (Trenimon) in der Klinik. In II. Int. Symp. Chemotherapie, Neapel.
- KLEINSMITH, L.J., V.G. ALLFREY, and A.E. MIRSKY, 1966: Phosphorylation of nuclear protein early in the course of gene activation in lymphocytes. *Science* 154, 780-781.
- KOLLER, P.C., 1954: Chromosome breakage. In BUTLER, J.A.V., and I.T. RANDALL (ed.), *Progr. Biophys.* IV. Pergamon Press, London, pp 195-243.
- KOWARZYK, H., H. STEINHAUS, and S. SZYMANIEC, 1965: Arrangement of chromosomes in human cells. I Association in metaphase figures. *Bull. Acad. pol. Sci. Cl.2* 12, 321-326.
- KOWARZYK, H., H. STEINHAUS, and S. SZYMANIEC, 1966: Arrangement of chromosomes in human cells. III Distribution of centromeres and orientation of chromosomes in metaphase. *Bull. Acad. pol. Sci. Cl.2* 14, 541-544.
- KOWARZYK, H., H. STEINHAUS, and S. SZYMANIEC, 1967: Arrangement of chromosomes in human cells. V Singularities of centromere distribution. *Bull. Acad. pol. Sci. Cl.2* 15, 137-142.
- KOZURA, S., and G.E. MORRE, 1966: Microcinematographic and autoradiographic study on the pattern of ^3H -thymidine uptake in the life cycle of the individual cell of the HeLa strain in vitro. *J. nat. Cancer Inst.* 36, 623-630.
- LATWA, L.G., 1963: On the concept of the cell cycle. *J. cell. comp. physiol.* 62, Suppl. I, 143-145.
- LEE, D.E., 1955: Action of radiations on living cells. Second edition. Cambridge, at the University Press.

- LIMA-DE-FARIA, A., and J. REITLAU, 1963: Heterochromatin in human male leukocytes. *J. Cell Biol.* 16, 315-322.
- LIMA-DE-FARIA, A., J. REITLAU, and M.A. O'SULLIVAN, 1965: Replication of autosomal heterochromatin in man. *Chromosoma* 16, 152-161.
- LINKE, A., 1960: Die Behandlung der Hämoblastosen und malignen Tumoren mit Tris-aethyleniminobenzochinon. *Dtsch. med. Wschr.* 85, 1928-1936.
- LISS, E. und G. PALME, 1964: Der Einfluß von alkylierenden Zytostatika auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. *Mitteilungsdienst GBK IV*, 457-487.
- LOVELESS, A., 1953: Chemical and biochemical problems arising from the study of chromosome breakage by alkylating agents and heterocyclic compounds. *Heredity* 6, Suppl., 293-298.
- LOVELESS, A., 1966: Genetic and allied effects of alkylating agents Butterworths, London.
- LUCAS, Z.J., 1967: Pyrimidine nucleotide synthesis: regulatory control during transformation of lymphocytes in vitro. *Science* 156, 1237-1240.
- LÜERS, H., 1955: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatika. *Z. Krebsforsch.* 60, 528-535.
- LÜERS, H. und H. ULRICH, 1959: Genetik und Evolutionsforschung bei Tieren. In HEBERER, G. *Die Evolution der Organismen*, 2. Auflage, Band 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 552-664.
- LÜERS, H. und G. RÖHRBORN, 1961: Genetische Schäden durch Chemotherapeutika. *Wissen und Praxis* 22, 3-23.
- LÜERS, H. und G. RÖHRBORN, 1965: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung III. Äthylenimine. *Mut. Res.* 2, 29-44.
- MACIELIRA-COELHO, A., J. PONTEN, and L. PHILIPSON, 1966: The division cycle and RNA-synthesis in diploid human cells at different passage levels in vitro. *Exp. Cell Res.* 42, 673-684.
- MAC KINNEY, A., F. STOHLMAN, and G. BRECHER, 1961: Kinetics of leukocyte proliferation in vitro. *Clin. Res.* 2, 163.
- MANTEL, N., and C.L. GREENBLATT, 1962: Excessive variation in radiation-induced chromosome aberrations. *Nature* 193, 795-796.

- MARSHALL, W.H., K.B. ROBERTS, W. and E. HALL, 1965: Continuous cinematography of human lymphocytes cultured with a phytohaemagglutinin including observations on cell division and interphase. *Quart. J. exp. Physiol.* 50, 361-374.
- MCLEISH, J., 1952: The action of maleic hydracide in *Vicia*. *Heredity* 6, Suppl., 125-147.
- MELLMAN, W.J., 1965: Human peripheral blood leukocyte cultures. In YUNIS, J.J. (ed.), *Human chromosome methodology*. Acad. Press. New York and London, pp 22-49.
- MERRINGTON, H., and L.S. PENROSE, 1964: Distances which involve satellited chromosomes in metaphase preparations. *Ann. hum. Genet.* 27, 257-259.
- MICHAELIS, A. und R. RIEGER, 1960: Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba* L. *Der Züchter* 30, 150-163.
- MICHAELIS, A., R. RIEGER und G. SIEBER, 1964: Über die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Halogenbuthyläther bei *Vicia faba* L. *Biol. Zbl.* 83, 173-187.
- MICHALOWSKI, A., 1963: Time-course of DNA synthesis in human leukocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 32, 609-612.
- MILES, C.P., and F. O'NEILL, 1966: Prominent secondary constrictions in a pseudodiploid human cell line. *Cytogenetics* 5, 321-334.
- MILLER, O.J., B.B. MUKHERJEE, W.R. BREGG, and A. VAN N. GAMBLE, 1963a: Non-random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leukocytes I. The peripheral location of the Y-chromosome. *Cytogenetics* 2, 1-14.
- MILLER, O.J., W.R. BREGG, B.B. MUKHERJEE, A. VAN N. GAMBLE, and A.C. CHRISTAKOS, 1963b: Non-random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leukocytes II. The peripheral location of chromosomes 13, 17-18 and 21. *Cytogenetics* 2, 152-167.
- MOORHEAD, P.S., and V. DEFENDI, 1963: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 16, 202-210.
- MOUTSCHEN, J.M., MOUTSCHEN-DAHMEN, M., M. VERLY, and G. KOCH, 1960: Autoradiograms with tritiated myleran. *Exp. Cell Res.* 20, 585-588.
- MUKHERJEE, B.B., and A.K. SINHA, 1966: Patterns of DNA replication in cultured cells from human females. *J. med. Genet.* 2, 192-199.

- HULLER, H.J., 1928: The problem of genetic modification. Verh. 5. Kongr. für Vererb., 1927. Z. Vererbgs1. Suppl. 1, 234-260.
- NEWSOME, J., 1966: Synthesis of RNA by stimulated human lymphocytes. Nature 206, 1013-1015.
- NICHOLS, W.W., 1966: Studies on the role of viruses in somatic mutations. Hereditas 55, 1-27.
- NORMAN, A., and M.S. SASAKI, 1966: Chromosome-exchange aberrations in human lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 11, 321-328.
- NOWELL, P.C., 1960: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20, 462-466.
- NOWELL, P.C., 1964: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. Exp. Cell Res. 33, 445-449.
- PUTI-RONCI, V., M. BRIAFTI, and P.L. IPATA, 1967: The influence of thymidine and deoxycytidine on the chromosome breaking effect of TEM in Vicia faba. Mut. Res. 4, 315-321.
- OBE, G., 1967: Untersuchungen über die Wirkung einer alkylierenden Verbindung (Chinon I) auf menschliche Chromosomen in vitro. Inaugural-Diss., Berlin.
- OBE, G., 1968: Pers. Mitteilung.
- OBRECHT, P., M. RICHTER and W. OEHLERT, 1968: Zur Wirkungsweise des Cytostatikums 2,3,5-Tris-aethylenimino-benzochinon-(1,4) auf den Nucleinsäurestoffwechsel. Arzneimittelforschg. 18, 151-156.
- OCKEY, C.H., 1959: Chromatid aberrations induced by ethylenimines. In STUBBE, H., Chemische Mutagenese. Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen I. Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med., Jahrgang 1960, Nr. 1.
- OCKEY, C.H., 1957: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acetythylenimine and triethylene melamine on root-tips of Vicia faba. J. Genet. 55, 525-550.
- OCKEY, C.H., 1966: Peripheral location and ³H-thymidine late-labeling behaviour of chromosomes from human fibroblasts. In 3rd Int. Congr. hum. Genet., Chicago, Abstracts, pp 73-74.

- OEHLKERS, F., 1943: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiose durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Vererbungsl. 81, 313-341.
- OHNO, S., I.M. TRUJILLO, W.D. KAPLAN, and R. KINOSHITA, 1961: Nucleolus-organizers in the causation of chromosomal anomalies in man. Lancet 1961 II, 123-125.
- OLIVIERI, G., and I.G. BREWEN, 1966: Evidence for the non-random rejoining of chromatid breaks and its relation to the origin of sister-chromatid exchanges. Mut. Res. 3, 249-267.
- OSTERTAG, W., 1966a: Koffein- und Theophyllinmutagenese bei Zell- und Leukozytenkulturen des Menschen. Mut. Res. 3, 249-267.
- OSTERTAG, W., 1966b: Chemische Mutagenese an menschlichen Zellen in Kultur. Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Math.-nat. Klasse, Nr. 1.
- OSTERTAG, W. und B.J. GREIF, 1967: Die Erzeugung von Chromatidenbrüchen durch Koffein in Leukocytenkulturen des Menschen. Humangenetik 3, 282-294.
- PALME, G., and E. LISS, 1965: Effect of alkylating agents on the life cycle of Ehrlich tumour cells. Europ. J. Cancer 1, 245-251.
- PATAU, K., 1960: The identification of individual chromosomes, especially in man. Amer. J. hum. Genet. 12, 250-276.
- PATAU, K., 1965: Identification of chromosomes. In YUNIS, J.J. (ed.), Human chromosome methodology. Acad. Press, New York and London, pp 155-186.
- PILGRIM, C. und W. MAURER, 1965: Autoradiographische Untersuchungen über die Konstanz der DNS-Verdopplungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ³H- und ¹⁴C-Thymidin. Exp. Cell Res. 37, 183-199.
- POGO, B.G.T., V.G. ALLFREY, and A.E. MIRSKY, 1966: RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 805-812.
- POLGAR, P.R., J.M. POSTER, and S.R. COOPERBAND, 1968: Glycolysis as an energy source for stimulation of lymphocytes by PHA. Exp. Cell Res. 49, 231-237.

- RIEGER, R., 1966: Alternative Interpretationsversuche zur Entstehung chromosomaler Strukturumbauten. Bruch-Reunions- und Austauschhypothese. Biol. Zbl. 85, 29-46.
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS, 1962: Die Auslösung von Chromosomenaberrationen bei *Vicia faba* durch chemische Agentien. Eine Übersicht. Die Kulturpflanze 10, 212-292.
- RIEGER, R., and A. MICHAELIS, 1965: Chemical induction of heat reversible "potential lesions" in *Vicia faba* chromosomes. Nature 206, 741-742.
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS, 1967: Chromosomenmutationen. G. Fischer Verlag, Jena.
- ROBBINS, J.H., 1964: Tissue culture studies of the human lymphocyte. Science 146, 1648-1654.
- RÖHRBORN, G., 1965a: Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. Humangenetik 1, 205-231.
- RÖHRBORN, G., 1965b: Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus. Humangenetik 1,
- RÖHRBORN, G., 1966: Über einen Geschlechtsunterschied in der mutagenen Wirkung von Trenimon bei der Maus. Humangenetik 2, 81-82.
- RÖHRBORN, G., and H. BERRANG, 1967: Dominant lethals in young female mice. Mut. Res. 4, 231-233.
- ROHRBORN, G. und F. VOGEL, 1967: Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säugetier und Mensch. Dtsch. med. Wschr. 92, 2315-2321.
- ROSS, W.C.I., 1958: In vitro reactions of biological alkylating agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 669-681.
- ROSS, W.C.I., 1962: Biological alkylating agents. Butterworths, London.
- ROTHFELS, K.H., and L. SIMINOVITCH, 1957: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. Stain Technol. 32, 73-77.
- ROTHFELS, K.H., and L. SIMINOVITCH, 1958: The chromosome complement of the rhesus monkey. Chromosoma 2, 163-175.
- RUHIN, A.D., and H.L. COOPER, 1965: Evolving patterns of RNA metabolism during transition from resting state to active growth in lymphocytes stimulated by PHA. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 469-476.

- SALZMAN, N.P., M. PELLEGRINO, and P. FRANCESCHINI, 1966:
Biochemical changes in PHA stimulated human lymphocytes.
Exp. Cell Res. 44, 73-83.
- SASAKI, M.S., and A. NORMAN, 1966: Proliferation of human
lymphocytes in vitro. Nature 210, 913.
- SAX, K., 1940: An analysis of X-ray induced chromosomal
aberrations in Tradescantia. Genetics 25, 41-68.
- SCHLEIERMACHER, E., 1966: Über den Einfluß von Trenimon und
Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus.
Humangenetik 2, 134-155.
- SCHMID, W., 1963: DNA replication patterns of human chromosomes.
Cytogenetics 2, 175-193.
- SCHÖNEICH, J., 1967: The induction of chromosomal aberrations
by hydrogen peroxide in strains of ascites tumors in mice.
Mut. Res. 4, 384-388.
- SCOTT, D., and H.J. EVANS, 1964: On the non-requirement for
deoxyribonucleic acid synthesis in the production of
chromosome aberrations by 8-ethoxycaffeine.
Mut. Res. 1, 146-156.
- SHAPIRO, J.M., and L.Y. LEVINA, 1967: Autoradiographical study
on the time of nuclear protein synthesis in human blood
cultures. Exp. Cell Res. 47, 75-85.
- SHARMA, A.K., and A. SHARMA, 1960: Spontaneous and chemically
induced chromosome breaks. Int. Rev. Cytol. 10, 101-136.
- SHAW, M.W., and M.M. COHEN, 1965: Chromosome exchanges in
human leukocytes induced by mitomycin C. Genetics 51, 181-190.
- STEWART, J.S.S., 1967: Meiotic and mitotic mechanisms.
Ann. hum. Genet. 31, 95.
- STUBBE, H., 1937: Der gegenwärtige Stand der experimentellen
Erzeugung von Mutationen durch Einwirkung von Chemikalien.
Angew. Chemie 50, 241-254.
- STUBBE, H. (Ed.), 1961: Strahleninduzierte Mutagenese. Erwin-
Baur-Gedächtnisvorlesungen II. Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berl.
Kl. Med., Jahrgang 1962, Nr. 1.
- SWANSON, C.P., 1960: Cytologie und Cytogenetik. G. Fischer
Verlag, Stuttgart.
- SWIFT, H., 1965: Molecular morphology of the chromosome. In
YERGANIAN, G. (ed.), The chromosome. Tissue culture
Association, Miami, pp 26-49.

- SZYBALSKI, W., 1967: Molecular events resulting in radiation injury, repair and sensitization of DNA. *Radiation Res. Suppl.* 7, 147-159.
- TAYLOR, H., W.F. HAUNT, and J. TUNG, 1962: Effects of fluoro-deoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage, and reunion. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 48, 190-198.
- TOLIVER, A., and E.H. SIMON, 1967: DNA synthesis in 5-Bromouracil tolerant HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 45, 603-617.
- TORELLI, U., D. QUAGLINO, T. ARTUSI, G. EMILIA, G. FERRARI, and C. MAURI, 1966: An autoradiographic study of the RNA and protein metabolism of normal plasma cells and phytohaem-agglutinin-stimulated lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 42, 1-9.
- TROWELL, O.A., 1966: Tissue culture in radiobiology. In WILLMER, E.N. (ed.), *Cells and tissues in culture III*. Acad. Press, New York and London, pp 64-149.
- VIG, B.K., S.B. KONTRAS, E.F. PADDOCK, and L.D. SAMUELS, 1968: Daunomycin-induced chromosomal aberrations and the influence of arginine in modifying the effect of the drug. *Mut. Res.* 5, 279-287.
- VOGEL, F., and M. VRBA, 1967: Influence of chloramphenicol on the reunion frequency of cytoxan-induced chromosome breaks in HeLa cells. *Mut. Res.* 4, 874-875.
- VRBA, M., 1967a: Wirkung von Endoxan auf die Chromosomen von HeLa-Zellen. *Humangenetik* 4, 362-370.
- VRBA, M., 1967b: Chromosomenaberrationen hervorgerufen durch Scopolamium hydrobromatum. *Humangenetik* 4, 371-373.
- WARWICK, G.P., 1963: The mechanism of action of alkylating agents. *Cancer Res.* 23, 1315-1333.
- WEGEHAUPT, S. und H.J. SEHRBUNDT, 1967: Cytologische Untersuchungen an HeLa-Zellen nach kurzfristigen 2,3,5-Tris-aethyleniminobenzochinon-1,4-Gaben (Trenimon). *Naturwissenschaften* 54, 123.
- WHEELER, G.P., 1962: Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: A review. *Cancer Res.* 22, 651-688.
- WINTER, G.C.B., and J.M. YOFFEY, 1966: Incorporation of ^3H -5-uridine by human peripheral mononuclear leukocytes changing from the non-multiplying to the multiplying state. *Exp. Cell Res.* 43, 84-94.

- WITKIN, E.M., 1966: Radiation- induced mutations and their repair. *Science* 152, 1345-1353.
- WOLFF, S., (ed.) 1963: Radiation- induced chromosome aberrations. Columbia University Press, New York and London.
- WOLFF, S., and H.E. LUIPPOLD, 1956: The production of two different types of chromosomal breaks by ionizing radiations. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 42, 510-514.
- YERGANIAN, G.S., S. CHO, T. HO, and M.N. NELL, 1965: Euploidy and chromosome alterations in normal, malignant, and tumor-virus transformed cells of the chinese and armenian hamsters. In *Somatic cells*. Publish. House Czechoslov. Acad. Sci., Prague, pp 349-360.

Verzeichnis der in den Abbildungen und Tabellen benutzten Abkürzungen

A :	asymmetrische Translokation
AL :	achromatische Läsion
B' :	Chromatidbruch
B'' :	Isochromatidbruch
C :	vollständige Translokation
I :	unvollständige Translokation
K :	Kontrolle
MI :	Mitoseindex
N :	Anzahl der ausgewerteten Platten
NP :	nicht polarisierte Translokation
P :	polarisierte Translokation
P :	Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen
Prob. :	Probits
r :	Korrelationskoeffizient
RB' :	Translokation
RB'B'' :	Triradial
S :	symmetrische Translokation
U :	U-förmige Translokation
X :	X-förmige Translokation

Tab. 1

Mitoseindices der Kontrollen aus Versuchsserie A und B
Prüfung auf Homogenität

Kontrolle	N	Zahl der Mitosen	MI %	P
K ₁	1000	43	3,70	0,64
K ₂	1000	33		
K ₃	1000	35		
K ₄	1000	37		
K ₅	1000	69	6,48	0,44
K ₆	1000	59		
K ₇	1000	55		
K ₈	1000	62		
K ₉	1000	68		
K ₁₀	1000	76		
K ₁₁	1000	81	8,86	0,60
K ₁₂	1000	91		
K ₁₃	1000	99		
K ₁₄	1000	90		
K ₁₅	1000	82		
	15000	980	6,53	≤ 0,001

Tab. 2

Versuchsserie A:

Mitoseindices der behandelten Kulturen

Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung

in unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon $\times 10^{-7}$ Mol	N	Zahl der Mitosen	MI %
0,25	5000	232	$4,64 \pm 0,30$
0,75	8000	307	$3,84 \pm 0,22$
1,00	6000	195	$3,25 \pm 0,23$
2,50	10000	96	$0,96 \pm 0,10$
$5,00_a^x)$	6000	24	$0,40 \pm 0,08$
$5,00_b^x)$	4000	57	$1,43 \pm 0,19$
$5,00_{a+b}$	10000	81	0,81
10,00	4000	-	$0 \pm 0,06$

^{x)} Wenn sich die Mitoseindices zwischen den Kulturen eines Versuches signifikant unterschieden ($P < 0,01$) wurden diese unter a und b auch getrennt aufgeführt

Tab. 3

Versuchsserie A: Zahl der verschiedenen Aberrationen pro Zelle
 Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung in
 unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon $\times 10^{-7}$ /Mol	N	B'		AL		B''		RB'		B' + AL + 2·RB'	
		absol.	pro Platte	absol.	pro Platte	absol.	pro Platte	absol.	pro Platte	absol.	pro Platte
0,00	950	50	0,05 $\pm$ 0,01	106	0,11 $\pm$ 0,01	5	0,005 $\pm$ 0,002	-	-		
0,25	200	134	0,67 $\pm$ 0,06	91	0,46 $\pm$ 0,05	69	0,35 $\pm$ 0,04	21	0,11 $\pm$ 0,02		
0,75	200	244	1,22 $\pm$ 0,09	147	0,74 $\pm$ 0,06	120	0,60 $\pm$ 0,05	27	0,14 $\pm$ 0,03		
1,00	200	305	1,53 $\pm$ 0,11	175	0,88 $\pm$ 0,07	142	0,71 $\pm$ 0,06	42	0,21 $\pm$ 0,03	564	2,82 $\pm$ 0,18
2,50	200	648	3,24 $\pm$ 0,17	331	1,66 $\pm$ 0,09	188	0,99 $\pm$ 0,08	70	0,35 $\pm$ 0,04	1139	5,60 $\pm$ 0,25
5,00	200	862	4,31 $\pm$ 0,18	470	2,35 $\pm$ 0,11	251	1,26 $\pm$ 0,10	218	1,09 $\pm$ 0,08	1768	8,84 $\pm$ 0,33

Tab. 4

Versuchsserie A: Häufigkeiten geschädigter Zellen in Prozent.
 aufgeschlüsselt nach verschiedenen Schädigungstypen
 Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung in
 unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon $\times 10^{-7}$ Mol	N	B'		AL		B''		RB'	
		absol.	%	absol.	%	absol.	%	absol.	%
0	950	50	5,3 $\pm$ 0,7	106	11,2 $\pm$ 1,0	5	0,5 $\pm$ 0,2	-	-
0,25	200	90	45 $\pm$ 3,5	70	35 $\pm$ 3,4	55	27,5 $\pm$ 3,2	19	9,5 $\pm$ 2,1
0,75	200	135	67,5 $\pm$ 3,3	111	55,5 $\pm$ 3,5	89	44,5 $\pm$ 3,5	25	12,5 $\pm$ 2,3
1,00	200	148	74 $\pm$ 3,1	115	57,5 $\pm$ 3,5	95	47,5 $\pm$ 3,5	40	20 $\pm$ 2,8
2,50	200	185	92,5 $\pm$ 1,9	170	85,0 $\pm$ 2,5	111	55,5 $\pm$ 3,5	62	31,0 $\pm$ 3,3
5,00	200	194	97 $\pm$ 1,2	177	88,5 $\pm$ 2,3	118	59 $\pm$ 3,5	122	61 $\pm$ 3,4

Tab. 5

Versuchsserie A: Probitanalyse zur Häufigkeit geschädigter Zellen bei logarithm. Dosenskala
Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung in unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon $\times 10^{-7}$ Mol	Log. Dosis - 8	B'				AL				B''				RB'			
		%	beob. Prob.	erwart. Prob.	P	%	beob. Prob.	erwart. Prob.		%	beob. Prob.	erwart. Prob.	P	%	beob. Prob.	erwart. Prob.	P
0,25	0,39794	45,0	4,87	4,75		35,0	4,62	4,43		27,5	4,40	4,46		9,5	3,69	3,43	
0,75	0,87506	67,5	5,45	5,51		55,5	5,14	5,14		44,5	4,86	4,77		12,5	3,85	4,05	
1,00	1,0000	74,0	5,64	5,70	0,34	57,5	5,19	5,32	0,045	47,5	4,94	4,85	0,50	20,0	4,16	4,20	0,003
2,50	1,39794	92,5	6,44	6,34		85,0	6,04	5,92		55,5	5,14	5,11		31,0	4,50	4,72	
5,00	1,69897	97,0	6,88	6,81		88,5	6,20	6,37		59,0	5,23	5,30		61,0	5,28	5,10	

Tab. 6

Versuchsserie B:

Mitoseindices der behandelten Kulturen

Trenimonzugabe ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) zu unterschiedlichen Terminen

Einwirkungs- zeit (Stunden)	N	Zahl der Mitosen	MI %
0	15000	980	6,53
2	6000	356	5,93 $\pm$ 0,31
8	24000	117	0,49 $\pm$ 0,05
12a ^{x)}	9000	13	0,14 $\pm$ 0,04
12b ^{x)}	3000	24	0,80 $\pm$ 0,16
12a+b	12000	37	0,31
16a	12000	136	1,13 $\pm$ 0,10
16b	14000	57	0,41 $\pm$ 0,05
16a+b	26000	193	0,74
20	24000	267	1,11 $\pm$ 0,07
24	10000	96	0,96 $\pm$ 0,10
40	14000	67	0,48 $\pm$ 0,06

^{x)} Wenn sich die Mitoseindices zwischen den Kulturen eines Versuches signifikant unterschieden ($P < 0,01$) wurden diese unter a und b auch getrennt aufgeführt

Tab. 7

Versuchsserie B: Häufigkeiten d. verschiedenen Aberrationen pro Zelle
Trenimonzugabe ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) zu unterschiedlichen
Terminen

Einwirkungs- zeit (Stunden)	N	B'		AL		B''		RB'	
		absol.	pro Platte	absol.	pro Platte	absol.	pro Platte	absol.	pro Platte
0	950	50	0,05 $\pm$ 0,01	106	0,11 $\pm$ 0,01	5	0,005 $\pm$ 0,002	-	-
2	100	110	1,10 $\pm$ 0,12	482	4,82 $\pm$ 0,34	20	0,2 $\pm$ 0,05	-	-
8	100	229	2,29 $\pm$ 0,17	337	3,37 $\pm$ 0,21	53	0,53 $\pm$ 0,08	2	0,02 $\pm$ 0,03
12	100	245	2,45 $\pm$ 0,23	277	2,77 $\pm$ 0,18	53	0,53 $\pm$ 0,09	11	0,11 $\pm$ 0,03
16	100	280	2,80 $\pm$ 0,21	236	2,36 $\pm$ 0,16	61	0,61 $\pm$ 0,09	19	0,19 $\pm$ 0,05
20	100	315	3,15 $\pm$ 0,24	203	2,03 $\pm$ 0,15	63	0,63 $\pm$ 0,09	38	0,38 $\pm$ 0,07
24	200	648	3,24 $\pm$ 0,17	331	1,66 $\pm$ 0,09	188	0,99 $\pm$ 0,08	70	0,35 $\pm$ 0,04
40	100	371	3,71 $\pm$ 0,25	160	1,60 $\pm$ 0,12	120	1,2 $\pm$ 0,14	87	0,87 $\pm$ 0,10

Tab. 8

Versuchsserie B: Häufigkeiten geschädigter Zellen, aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Schädigungstypen
Trenimonzugabe ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) zu unterschiedlichen Terminen

Einwirkungs- zeit (Stunden)	N	B'		AL		B''		RB'	
		absol.	%	absol.	%	absol.	%	absol.	%
0	950	50	5,3 $\pm$ 0,7	106	11,2 $\pm$ 1,0	5	0,5 $\pm$ 0,2	-	-
2	100	62	62,0 $\pm$ 4,8	97	97,0 $\pm$ 1,7	15	15,0 $\pm$ 3,6	-	-
8	100	91	91,0 $\pm$ 2,9	94	94,0 $\pm$ 2,4	37	37,0 $\pm$ 4,8	2	2,0 $\pm$ 3,40
12	100	85	85,0 $\pm$ 3,6	94	94,0 $\pm$ 2,4	34	34,0 $\pm$ 4,7	10	10,0 $\pm$ 3,0
16	100	87	87,0 $\pm$ 3,4	93	93,0 $\pm$ 2,5	39	39,0 $\pm$ 4,9	17	17,0 $\pm$ 3,8
20	100	91	91,0 $\pm$ 2,9	88	88,0 $\pm$ 3,2	44	44,0 $\pm$ 5,0	28	28,0 $\pm$ 4,5
24	200	185	92,5 $\pm$ 1,9	170	85,0 $\pm$ 2,5	111	55,5 $\pm$ 3,5	62	31,0 $\pm$ 3,3
40	100	94	94,0 $\pm$ 2,4	84	84,0 $\pm$ 3,7	58	58,0 $\pm$ 4,9	52	52,0 $\pm$ 4,9

Tab. 9

Versuchsserie C:

Mitoseindizes der Kontrollen und der Versuche, von denen jeder zweimal ausgeführt wurde (a, b)

Nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer (Δt_2) von 1×10^{-6} Mol Trenimon, Zugabe einer zweiten, unbehandelten Kultur

Kontrollen	N	Zahl der Mitosen	MI %
K ₁	1000	43	4,3
K ₂	1000	49	4,9
K ₃	1000	58	5,8
K ₄	1000	59	5,9
K ₅	1000	60	6,0
K ₆	1000	61	6,1
K ₇	1000	68	6,8
K ₈	1000	69	6,9
K ₉	1000	119	11,9
	9000	586	6,51
Versuche			
Einwirkungsdauer			
(Δt_2) (Stunden)			
0 ^{a)}	3000	8	0,27
0 ^{b)}	3000	16	0,53
1 ^{a)}	3000	5	0,17
1 ^{b)}	3000	10	0,33
3 ^{a)}	3000	3	0,10
3 ^{b)}	3000	7	0,23
6 ^{a)}	3000	8	0,27
6 ^{b)}	3000	14	0,47
12 ^{a)}	3000	21	0,70
12 ^{b)}	3000	24	0,80
24 ^{a)}	3000	54	1,80
24 ^{b)}	3000	108	3,60

Tab. 10

Versuchsserie C: Umrechnung der Aberrationen pro Zelle von 16, 18 und 20-stündiger Einwirkungszeit auf 24 stündige Einwirkungszeit
 Nach unterschiedlicher Einwirkungszeit
 einer zweiten, unbehandelten Kultur

Einwirkungs- dauer (Δt_2) (Stunden)	gemeins. Einwirkungs- zeit (Stunden)	N	B' absol.	AL absol.	B'' absol.	RB' absol.	B' + AL + 2 · RB' absol.	Korrekt. ^{x)}		(B' + AL + 2 · RB') korrig. pro Platte
								Faktor	absol.	
6	18	100	477	342	151	69	957	0,975	933	9,33 ± 0,53
12	16	100	288	334	81	45	712	1,01	719	7,19 ± 0,43
24	20	100	167	103	48	19	308	0,94	290	2,90 ± 0,24

^{x)} Die Berechnung des Korrekt. Faktors wird auf S.36 beschrieben

Tab. 11

Versuchsserie D: Markierungsmuster der Mitosen einer trenimonbehandelten Kultur
 ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) sowie dreier Kontrollen
 Probitanalyse zur Häufigkeit markierter Metaphasen in
 Abhängigkeit von der Dauer der Colcemideinwirkung (h)

Zeitpunkt der Substanz- zugabe vor der Aufarbei- tung (Stunden)	³ H-TdR	Colcemid	Trenimon	N	markierte Mitosen		Probits		h	1 - Log. h
					abs.	%	beob.	erwart.		
8	4	-	-	318	223	70,1	5,53	5,55	4	0,398
8	5	-	-	324	209	64,5	5,37	5,31	5	0,301
8	6	-	-	323	172	53,3	5,08	5,11	6	0,222
8	4	8	8	92	17	18,5	4,10	--	4	0,398

Tab. 12

Versuchsserie A: Vergleich der interzellulären Verteilung der Aberrationen mit der entsprechenden

Poisson-Kurve, wobei + (-) bedeutet, daß der empir. Wert über (unter) dem theoret. liegt

Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung in unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon x10 ⁻⁷ /Mol Aberrat. pro Zelle		B'					AL					B''					RB' 5,0
		0,25	0,75	1,0	2,5	5,0	0,25	0,75	1,0	2,5	5,0	0,25	0,75	1,0	2,5	5,0	
0		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1		-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
3		+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4		+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
5		+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
6		+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7			+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9			+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10				-	+	+											
>10			+	+	+	+											
P		0,34	0,12	0,04	0,001	0,03	0,40	0,33	0,80	0,29	0,56	0,50	0,70	0,26	0,001	0,001	0,009

Tab. 13

Versuchsserie B: Verteilung der Aberrationen mit der entsprechenden Poisson-Kurve, wobei + (-) bedeutet, daß der empir. Wert über (unter) dem theoret. liegt.

Trenimonzugabe ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) zu unterschiedlichen Terminen

Einwirkungs- zeit Aberrat. pro Zelle	B'										AL			
	2	8	12	16	20	24	40	2	8	12	16	20	24	40
0	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
6		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7		+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
8			-	+	+	+	+	-	+					
9			+	+	+	+	+	+	+					
10			-	+	+	-		+	+					
>10			+		+	+								
P	0,44	0,25	0,09	0,34	0,18	0,001	0,002	0,001	0,96	0,57	0,42	0,83	0,29	0,46

Tab. 14

Vergleich der interchromosomalen Verteilung der Läsionen nach 2 und 24 stündiger Einwirkungszeit des Trenimon untereinander, sowie mit der theoret. Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt

Chromosom, Gruppe	Einwirkungszeit: 2 Stunden			Einwirkungszeit: 24 Stunden			vgl. 2 u. 24 chi ²	Gesamtmaterial		
	empir.	theor.	chi ²	empir.	theor.	chi ²		empir.	theor.	chi ²
1	61	43,7	6,85	42	26,2	9,50	0,47	103	69,9	15,65
2	52	40,7	3,17	32	24,4	2,37	0,01	84	65,0	5,53
3	37	34,0	0,26	16	20,4	0,95	1,21	53	54,4	0,04
4-5	50	61,1	2,00	34	26,6	0,19	0,32	84	97,7	1,92
6-12, X	190	180,9	0,46	110	108,5	0,02	0,09	300	289,4	0,39
13-15	50	50,8	0,01	27	30,5	0,40	0,19	77	81,3	0,23
16	17	15,6	0,14	9	9,3	0,01	0,09	26	24,9	0,05
17-18	24	28,4	0,70	18	17,1	0,05	0,51	42	45,5	0,27
19-20	10	23,4	7,63	7	14,0	3,51	0,10	17	37,4	11,10
21-22	9	21,6	7,35	5	13,0	4,89	0,02	14	34,6	12,33
	500	500,2	28,57	300	300,0	21,89	3,01	800	800,1	47,32
	P=0,0008			P=0,01			P=0,96	P<10 ⁻⁶		

Tab. 15

Vergleich der interchromosomalen Verteilung der Brüche und Translokationen nach 24-stündiger Einwirkungszeit des Trenimon mit der theoret.

Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt

Chromosom, Gruppe	B'			RB'		
	empir.	theoret.	chi ²	empir.	theoret.	chi ²
1	33	35,0	0,11	44	38,6	0,75
2	34	32,5	0,07	38	35,9	0,12
3	19	27,2	2,47	31	30,1	0,03
4-5	54	48,8	0,55	52	54,0	0,07
6-12, X	153	144,7	0,47	170	159,9	0,64
13-15	43	40,6	0,14	51	44,9	0,83
16	16	12,4	1,02	9	13,8	1,64
17-18	15	22,8	2,65	18	25,2	2,03
19-20	17	18,7	0,15	14	20,6	2,14
21-22, Y	16	17,3	0,09	15	19,1	0,88
	400	400,0	7,72	442	442,1	9,13
	P=0,56			P=0,43		

Tab. 16

Vergleich der Verteilung der Läsionen und Brüche auf lange (LA) und kurze Arme (KA) mit der theoret. Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt

Chromosom, Gruppe	empir.		AL theoret.		chi ²	P
	LA	: KA	LA	: KA		
2	60	24	51,2	32,8	3,87	0,05
4-5	72	12	60,9	23,1	7,36	0,007
6-12, X	242	58	195,3	104,7	32,00	≪ 0,001
	374	94	307,4	160,6	42,05	≪ 0,001

Chromosom, Gruppe	empir.		B' theoret.		chi ²	P
	LA	: KA	LA	: KA		
2	21	13	20,7	13,3	0,01	0,92
4-5	44	10	39,1	14,9	2,23	0,14
6-12, X	115	38	99,6	53,4	6,82	0,009
	180	61	159,4	81,6	7,86	0,005

Tab. 17

Beteiligung der einzelnen Chromosomen bzw. Gruppen an Translokationen (arab. Zahlen) und Abweichungen von der theoret. Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt (

[illegible]

Tab. 18

Vergleich der Beteiligung der Chromosomen an Translokationen mit der theoret. Erwartung, die sich aus der relativen Metaphaselänge ergibt

Chromosom	Kombinat. mit Chromosom, Gruppe	empir.	theor.	chi ²	P
a) 1	1	1	3,8		
	2	2	3,5	2,50	
	3	2	2,9		
	4-5	6	5,3	0,00	
	6-12, X	17	15,6		
	13-15	7	4,4	0,83	
	16-18	6	3,8		
	19-Y	2	3,9	0,02	
		43	43,2	3,35	0,34
b) 2	1	2	3,2		
	2	2	2,9	0,71	
	3	1	2,5		
	4-5	8	4,4	0,67	
	6-12, X	15	13,0		
	13-15	5	3,7	0,66	
	16-18	3	3,2		
	19-Y	0	3,2	1,81	
		36	36,1	3,85	0,28

Tab. 18 Forts.

Chromosom	Kombinat. mit Chromosom, Gruppe	empir.	theor.	chi ²	P
c) 3	1	2	2,5		
	2	1	2,4	0,50	
	3	2	2,0		
	4-5	4	3,5		
	6-12, X	15	10,5	1,76	
	13-15	3	3,0		
	16-18	1	2,6	1,19	
	19-Y	1	2,6		
		29	29,1	3,45	0,18
d) 4-5	1	6	4,4		
	2	8	4,1	3,66	
	3	4	3,4		
	4-5	2	6,1	1,29	
	6-12, X	18	18,1	0,00	
	13-15	6	5,1	0,17	
	16-18	2	4,4		
	19-Y	4	4,5	0,94	
		50	50,1	6,06	0,20
e) 6-12, X	1	17	12,1	2,02	
	2	15	11,2	1,27	
	3	15	9,4	3,37	
	4-5	18	16,9	0,08	
	6-12, X	32	49,9	6,44	0,012
	13-15	21	14,0	3,48	
	16-18	6	12,1	3,11	
	19-Y	14	12,4	0,20	
		138	138,0	19,97	0,006

Tab. 18 Forts.

Chromosom	Kombinat. mit Chromosom, Gruppe	empir.	theor.	chi ²	P
f) 13-15	1	7	4,2		
	2	5	3,9	1,88	
	3	3	3,3		
	4-5	6	5,9	0,00	
	6-12, X	21	17,4		
	13-15	3	4,9	0,14	
	16-18	1	4,2		
	19-Y	2	4,3	3,59	
		48	48,1	5,61	0,14
g) 16-18	1	6	2,2		
	2	3	2,1	2,61	
	3	1	1,7		
	4-5	2	3,1		
	6-12, X	6	9,2	1,52	
	13-15	1	2,6		
	16-18	2	1,7	0,02	
	19-Y	4	2,3		
		25	24,9	4,15	0,13
h) 19-Y	1	2	2,5		
	2	0	2,3	2,11	
	3	1	2,0		
	4-5	4	3,5		
	6-12, X	14	10,4	1,24	
	13-15	2	2,9		
	16-18	4	2,5	0,02	
	19-Y	1	1,9		
		28	28,0	3,37	0,18

Tab. 19

Vergleich der intrachromosomalen Verteilung der Läsionen nach 2 und 24
stündiger Einwirkungszeit des Trenimon

a) Chromosomen 1 und 3, lange Arme von 2

Einwirkgs. - zeit	2 Stunden	24 Stunden		
Region	emp.	emp.	chi ²	P
0, 0-0, 2	27	6	0, 63	
0, 2-0, 4	41	18	1, 23	
0, 4-0, 6	41	18	0, 67	
0, 6-0, 8	23	24	0, 05	
0, 8-1, 0	<u>7</u>	<u>11</u>	<u>0, 73</u>	
	139	77	3, 31	<u>0, 50</u>

b) lange Arme der Chromosomen 4-5

0, 0-0-2	7	4	0, 40	
0, 2-0, 4	9	11	0, 67	
0, 4-0, 6	9	10	0, 35	
0, 6-0, 8	8	8		
0, 8-1, 0	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0, 79</u>	
	39	33	2, 21	<u>0, 54</u>

c) lange Arme der Chromosomen 6-12, X

0, 0-0, 2	18	13	1, 10	
0, 2-0, 4	64	26	0, 71	
0, 4-0, 6	46	21	0, 09	
0, 6-0, 8	25	11	0, 10	
0, 8-1, 0	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>2, 34</u>	
	162	80	4, 34	<u>0, 35</u>

Tab. 19 Forts.

d) Chromosomen 13-15

Einwirkgs. - zeit	2 Stunden	24 Stunden		
Region	emp.	emp.	chi ²	P
0, 0-0, 2	2	1		
0, 2-0, 4	22	6	0, 05	
0, 4-0, 6	15	8	0, 00	
0, 6-0, 8	11	11		
0, 8-1, 0	<u>0</u>	<u>1</u>	0, 12	
	50	27	0, 17	<u>0, 92</u>

e) Chromosomen 16-Y

0, 0-0, 2	2	5		
0, 2-0, 4	21	8	0, 03	
0, 4-0, 6	25	13	0, 18	
0, 6-0, 8	10	9		
0, 8-1, 0	<u>2</u>	<u>1</u>	0, 59	
	60	36	0, 80	<u>0, 67</u>

f) kurze Arme

0, 0-0, 2	1	2		
0, 2-0, 4	12	14	0, 82	
0, 4-0, 6	28	16	1, 93	
0, 6-0, 8	9	9		
0, 8-1, 0	<u>0</u>	<u>3</u>	0, 90	
	50	44	2, 65	<u>0, 26</u>

Tab. 20

Vergleich der intrachromosomalen Verteilung der Brüche und Läsionen

a) Chromosomen 1 und 3, lange Arme von 2

<u>Region</u>	Anzahl d. B'	Anzahl d. AL	<u>chi²</u>	<u>P</u>
	<u>emp.</u>	<u>emp.</u>		
0,0-0,2	18	38	1,40	
0,2-0,4	24	65	0,14	
0,4-0,6	9	59	5,67	
0,6-0,8	15	41	0,07	
0,8-1,0	<u>7</u>	<u>13</u>	<u>1,01</u>	
	73	216	8,29	0,09

b) lange Arme der Chromosomen 4-5

0,0-0,2	9	11	0,42	
0,2-0,4	13	20	0,03	
0,4-0,6	11	19	0,02	
0,6-0,8	7	16		
0,8-1,0	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>0,30</u>	
	44	72	0,77	0,68

c) lange Arme der Chromosomen 6-12, X

0,0-0,2	9	31	1,73	
0,2-0,4	39	90	0,23	
0,4-0,6	24	67	1,42	
0,6-0,8	21	36	0,56	
0,8-1,0	<u>22</u>	<u>18</u>	<u>9,51</u>	
	115	242	13,45	0,009

Tab. 20 Forts.

d) Chromosomen 13-15

<u>Region</u>	Anzahl d. B'	Anzahl d. AL	<u>chi²</u>	<u>P</u>
	<u>emp.</u>	<u>emp.</u>		
0, 0-0, 2	7	3		
0, 2-0, 4	14	33	0,18	
0, 4-0, 6	10	23	0,15	
0, 6-0, 8	8	17		
0, 8-1, 0	<u>1</u>	<u>1</u>	0,01	
	40	77	0,34	<u>0,74</u>

e) Chromosomen 16-Y

0, 0-0, 2	3	7		
0, 2-0, 4	21	29	0,06	
0, 4-0, 6	20	38	0,39	
0, 6-0, 8	11	19		
0, 8-1, 0	<u>5</u>	<u>3</u>	0,21	
	60	96	0,66	<u>0,72</u>

f) kurze Arme

0, 0-0, 2	5	3		
0, 2-0, 4	22	27	0,89	
0, 4-0, 6	15	45	6,47	
0, 6-0, 8	14	18	0,08	
0, 8-1, 0	<u>12</u>	<u>4</u>	7,52	
	68	97	14,96	<u>0,002</u>

Tab. 21

Vergleich der Verteilung der Brüche und Läsionen auf allen langen und sämtlichen kurzen Armen der Chromosomen mit der entsprechenden Poisson-Kurve

a) lange Arme

Region	Anzahl d. B'		P	Anzahl d. AL		P
	emp.	theor.		emp.	theor.	
0,0-0,1	11	5,3		14	13,8	
0,1-0,2	35	22,0		76	54,2	
0,2-0,3	56	45,4		113	106,5	
0,3-0,4	55	62,6		124	139,6	
0,4-0,5	34	64,7		109	137,3	
0,5-0,6	40	53,5		97	108,0	
0,6-0,7	39	36,9		77	70,8	
0,7-0,8	23	21,8		52	39,8	
0,8-0,9	21	11,3		25	19,6	
0,9-1,0	18	5,2		16	8,6	
			3×10^{-6}			0,0004

b) kurze Arme

0,0-0,1	0	0,6		0	1,2	
0,1-0,2	5	2,7		3	5,3	
0,2-0,3	11	6,5		6	11,6	
0,3-0,4	11	10,3		21	17,0	
0,4-0,5	7	12,4		24	18,6	
0,5-0,6	8	11,9		21	16,4	
0,6-0,7	5	9,5		12	12,0	
0,7-0,8	9	6,5		6	7,5	
0,8-0,9	3	3,9		3	4,1	
0,9-1,0	9	2,1		1	2,0	
			0,006			0,22

Tab. 22

Vergleich der intrachromosomalen Verteilung der Brüche mit der
entsprechenden Poisson-Kurve

a) Chromosomen 1 und 3, lange Arme von 2

Anzahl der Brüche

<u>Region</u>	<u>emp.</u>	<u>%</u>	<u>theor.</u>	<u>P</u>
0, 0-0, 2	18	24, 7	15, 1	
0, 2-0, 4	24	32, 9	23, 8	
0, 4-0, 6	9	12, 3	18, 8	
0, 6-0, 8	15	20, 6	9, 8	
0, 8-1, 0	7	9, 6	3, 9	
				0, 015

b) lange Arme der Chromosomen 4-5

0, 0-0, 2	9	20, 5	8, 6	
0, 2-0, 4	13	29, 6	14, 0	
0, 4-0, 6	11	25, 0	11, 5	
0, 6-0, 8	7	15, 9	6, 3	
0, 8-1, 0	4	9, 1	2, 6	
				0, 89

c) lange Arme der Chromosomen 6-12, X

0, 0-0, 2	9	7, 8	14, 5	
0, 2-0, 4	39	33, 9	30, 1	
0, 4-0, 6	24	20, 9	31, 1	
0, 6-0, 8	21	18, 3	21, 5	
0, 8-1, 0	22	19, 1	11, 1	
				0, 002

Tab. 22 Forts.

d) Chromosomen 13-15

Anzahl der Brüche

<u>Region</u>	<u>emp.</u>	<u>%</u>	<u>theor.</u>	<u>P</u>
0,0-0,2	7	17,5	8,5	
0,2-0,4	14	35,0	13,2	
0,4-0,6	10	25,0	10,2	
0,6-0,8	8	20,0	5,3	
0,8-1,0	1	2,5	2,0	
				0,87

e) Chromosomen 16-Y

0,0-0,2	3	5,0	9,0	
0,2-0,4	21	35,0	17,1	
0,4-0,6	20	33,3	16,2	
0,6-0,8	11	18,3	10,3	
0,8-1,0	5	8,3	4,9	
				0,21

f) kurze Arme

0,0-0,2	5	7,4	8,4	
0,2-0,4	22	32,4	17,6	
0,4-0,6	15	22,1	18,4	
0,6-0,8	14	20,6	12,8	
0,8-1,0	12	17,7	6,7	
				0,11

Tab. 23

Vergleich der intrachromosomalen Verteilung der Läsionen mit der
entsprechenden Poisson-Kurve

a) Chromosomen 1 und 3, lange Arme von 2

Anzahl der Läsionen

<u>Region</u>	<u>emp.</u>	<u>%</u>	<u>theor.</u>	<u>P</u>
0, 0-0, 2	38	17, 6	41, 18	
0, 2-0, 4	65	30, 1	68, 25	
0, 4-0, 6	59	27, 3	56, 56	
0, 6-0, 8	41	19, 0	31, 25	
0, 8-1, 0	13	6, 0	12, 95	
				0, 47

b) lange Arme der Chromosomen 4-5

0, 0-0, 2	11	15, 3	11, 84	
0, 2-0, 4	20	27, 8	21, 37	
0, 4-0, 6	19	26, 4	19, 29	
0, 6-0, 8	16	22, 2	11, 61	
0, 8-1, 0	6	8, 3	5, 24	
				0, 76

c) lange Arme der Chromosomen 6-12, X

0, 0-0, 2	31	12, 8	45, 58	
0, 2-0, 4	90	37, 2	76, 09	
0, 4-0, 6	67	27, 7	63, 51	
0, 6-0, 8	36	14, 9	35, 34	
0, 8-1, 0	18	7, 4	14, 75	
				0, 07

Tab. 23 Forts.

d) Chromosomen 13-15

Anzahl der Läsionen

<u>Region</u>	<u>emp.</u>	<u>%</u>	<u>theor.</u>	<u>P</u>
0,0-0,2	3	3,9	13,51	
0,2-0,4	33	42,9	23,51	
0,4-0,6	23	29,9	20,46	
0,6-0,8	17	22,1	11,87	
0,8-1,0	1	1,3	5,16	
				0,82

e) Chromosomen 16-Y

0,0-0,2	7	7,3	15,67	
0,2-0,4	29	30,2	28,40	
0,4-0,6	38	39,6	25,74	
0,6-0,8	19	19,8	15,55	
0,8-1,0	3	3,1	7,05	
				0,009

f) kurze Arme

0,0-0,2	3	3,1	14,11	
0,2-0,4	27	27,8	27,20	
0,4-0,6	45	46,4	26,22	
0,6-0,8	18	18,6	16,85	
0,8-1,0	4	4,1	8,12	
				6×10^{-5}

Tab. 24

Verteilung der Brüche und Läsionen auf das Chromosom Nr. 2

a) langer Arm

<u>Region</u>	<u>Anzahl d. B'</u>	<u>Anzahl d. AL</u>
0,0-0,1	1	3
0,1-0,2	2	9
0,2-0,3	5	11
0,3-0,4	4	8
0,4-0,5	1	7
0,5-0,6	3	8
0,6-0,7	4	7
0,7-0,8	1	3
0,8-0,9	0	3
0,9-1,0	<u>0</u>	<u>1</u>
	21	60

b) kurzer Arm

0,0-0,1	0	0
0,1-0,2	2	1
0,2-0,3	2	2
0,3-0,4	1	3
0,4-0,5	1	5
0,5-0,6	2	4
0,6-0,7	1	5
0,7-0,8	3	2
0,8-0,9	1	2
0,9-1,0	<u>0</u>	<u>0</u>
	13	24

Tab. 25

Versuchsserie A: Korrelation zwischen den Aberrationstypen und Prüfung der dazugehörigen Regressionen auf Linearität

Trenimonzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung in unterschiedlichen Konzentrationen

Trenimon $\times 10^{-7}$ Mol	B' / AL		B' / B''		B' / RB'		AL / B''		AL / RB'	
	r	Regression B' : AL F ⁸ ₁₉₀ 3,784	r	Regression B' : B'' F ⁸ ₁₉₀ 0,854	r	Regression B' : RB' F ⁸ ₁₉₀ 0,913	r	Regression AL : B'' F ⁶ ₁₉₂ 1,102	r	Regression AL : RB' F ⁶ ₁₉₂ 0,451
1,0	0,334	F ⁶ ₁₉₂ 2,084	0,281	F ³ ₁₉₅ 5,681	0,288	F ¹ ₁₉₇ 3,948	0,191	F ³ ₁₉₅ 2,254	0,186	F ¹ ₁₉₇ 0,087
2,5	0,417	F ⁶ ₁₉₂ 1,944	0,417	F ⁴ ₁₉₄ 0,172	0,228	F ¹⁰ ₁₈₈ 0,905	0,240	F ⁴ ₁₉₄ 4,886	0,122	F ¹ ₁₉₇ 2,167
5,0	0,357	F ⁶ ₁₉₂ 1,567	0,458	F ⁵ ₁₉₄ 0,473	0,324	F ³ ₁₉₅ 0,781	0,240	F ⁵ ₁₉₃ 0,910	0,212	F ³ ₁₉₅ 0,260

Tab. 26

Versuchsreihe B: Korrelation zwischen den Aberrationstypen und Prüfung der dazugehörigen Regressionen auf Linearität

Trenimonzugabe ($2,5 \times 10^{-7}$ Mol) zu unterschiedlichen Terminen

Einwirkgs.- zeit Stunden	B' / AL			B' / B''			B' / RB'			AL / B''			AL / RB'		
	r	Regression B' : AL AL : B'	r	Regression B' : B'' B'' : B'	r	Regression B' : RB' RB' : B'	r	Regression AL : B'' B'' : AL	r	Regression AL : RB' RB' : AL					
2	0,543	F_{94}^4 0,564 1,229	F_{88}^{10} 0,131	F_{94}^4 0,936 3,094	F_{96}^2		0,293	F_{88}^{10} 0,985 1,058	F_{96}^2						
8	0,502	F_{92}^6 1,694 1,579	F_{89}^9 0,365	F_{92}^6 0,889 2,804	F_{95}^3		0,291	F_{89}^9 2,623 1,775	F_{95}^3						
12	0,659	F_{88}^{10} 0,578 3,659	F_{92}^6 0,430	F_{88}^{10} 0,832 2,447	F_{94}^4		0,366	F_{93}^5 2,152 0,684	F_{94}^4						
16	0,535	F_{89}^9 1,123 1,569	F_{92}^6 0,445	F_{89}^9 1,381 1,064	F_{96}^2		0,296	F_{92}^6 1,318 0,619	F_{96}^2						
20	0,519	F_{88}^{10} 2,243 0,735	F_{92}^6 0,286	F_{88}^{10} 0,492 2,166	F_{95}^3		0,290	F_{92}^6 0,550 0,989	F_{95}^3						
40	0,210	F_{90}^8 0,790 0,725	F_{92}^6 0,534	F_{90}^8 1,718 0,233	F_{93}^5	F_{90}^8 0,397	F_{95}^3 1,126	F_{92}^6 0,403 0,775	F_{93}^5	F_{92}^6 0,093	F_{95}^3 1,000	F_{95}^3 0,258			

Tab. 27

Vergleich der interzellulären Verteilung sämtlicher Aberrationen eines Versuches der Serie A (5×10^{-7} Mol) mit einem der Serie C ($\Delta t_2 = 6$ Stunden)

Aberrat. <u>pro Zelle</u>	<u>Serie A</u>	<u>Serie C</u>	<u>chi²</u>
0 - 3	17	16	3,41
4	16	4	1,60
5	22	2	6,75
6	17	6	0,55
7	20	14	0,94
8	21	11	0,02
9	11	4	0,30
10	14	2	3,12
11	9	8	1,44
12	12	6	0,00
13-14	15	8	0,02
15-16	9	6	0,30
>16	<u>17</u>	<u>13</u>	<u>1,35</u>
	200	100	19,80

$$P = 0,07$$

Lebenslauf

Am 11. Mai 1941 wurde ich als Sohn des Hauptmanns Karl Sperling und seiner Ehefrau Herta, geb. Berger, in Kamenz/Sachsen geboren. Nach dem Besuch der Grundschulen in Kamenz und Pinneberg bestand ich Ostern 1951 die Aufnahmeprüfung an das "neusprachlich- mathemat. - naturwissenschaftliche Gymnasium" zu Elmshorn. Im Anschluß an das Abitur im Frühjahr 1960 begann ich mit dem Studium der Fächer Biologie, Chemie und Geographie in Hamburg. Nach vier Semestern ging ich nach Freiburg und kam von dort nach Abschluß des 7. Semesters als Austauschstudent nach Berlin. Hier legte ich am 30. März 1965 das Staatsexamen ab. Seit dieser Zeit bin ich Doktorand am Institut für Genetik der Freien Universität. Im April 1967 wurde ich mit der Wahrnehmung einer Assistentenstelle beauftragt. Im Frühjahr 1963 heiratete ich meine Frau Karin, geb. Seibicke. Wir haben eine Tochter.

